

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



TESIS DOCTORAL

**Importancia de los plásmidos ColE1 en la
resistencia a antibióticos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alfonso Santos López

DIRECTOR

Bruno González Zorn

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



TESIS DOCTORAL

Importancia de los Plásmidos ColE1 en la Resistencia a Antibióticos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alfonso Santos López

Director

Bruno González Zorn

Madrid, 2016

A mi abuelo Paco

A mis padres

“Se ha dicho tantas veces que el problema de España es un problema de cultura. Urge, en efecto, si queremos incorporarnos a los pueblos civilizados cultivar intensamente los yermos de nuestra tierra y de nuestro cerebro, salvando para la prosperidad y enaltecimiento patrios todos los ríos que se pierden en el mar y todos los talentos que se pierden en la ignorancia”

Santiago Ramón y Cajal. Madrid 1 de Mayo de 1922

Los plásmidos a menudo portan elementos que permite que sean estables en las poblaciones bacterianas. A mí me gustaría agradecer a esos “elemento estabilizadores” que me han acompañado estos años, y que me han ayudado de un modo u otro, a realizar esta tesis y a mejorar como científico:

A mis padres. Sería injusto empezar de otro modo que dándoos las gracias. Con vuestro ejemplo diario me habéis enseñado que si quiero puedo, que dónde llegue en la vida solamente va a depender de mi esfuerzo, de mi constancia y de mis ganas de llegar. Gracias por creer en mí y por apoyarme. Al final parece que la biología me ha dado de comer (al menos unos añitos). Gracias por haberos sacrificado por nosotros. Gracias la educación y los valores que me habéis dado, por vuestro amor y por vuestro cariño. Gracias por la familia que habéis formado.

A mis hermanos, mi mayor orgullo. Soy lo que soy en gran parte por vosotros. Sin saberlo habéis ido moldeando a un “científico” desde que era pequeño: Sergio me inculcaste tu gusto por el conocimiento y por la ciencia en general y Jesús y Mari Carmen siempre me habéis llevado la contraria aunque supiese que yo estaba en lo cierto, así que no me quedó más remedio que mejorar mis razonamientos al máximo para poder rebatiros (cosa que me sigue costando mucho a día de hoy). Además, si he sido un *copialotodo* vuestro es porque los tres sois grandes modelos a seguir: unas grandes personas, con unos muy buenos valores en la vida (además, por supuesto, de ser muy inteligentes y bellos: es frustrante no estar entre los 3 Santos López más listos y guapos de la casa).

Aunque no me guste nada la frase, se dice que “detrás de un gran hombre siempre hay una gran mujer”. Yo quiero modificar esa frase y convertirla en una que sí me gusta: “detrás de unos grandes hermanos, están los mejores cuñados”. Laura, Dani y Paz me encanta ser parte de vuestra familia.

A Inés, Henar y Noa. Desde que nacisteis, habéis hecho que mi vida sea mucho más feliz, y que intente –casi a diario- convertirme en mejor persona. Ahora mismo no sabéis leer, pero espero que algún día sepáis que hasta el día de hoy, sois lo más bonito que tengo.

A Álvaro San Millán, mi maestro y mi amigo. Esta tesis es tan tuya como mía. Gracias por facilitarme el camino, por ayudarme, escucharme y sobre todo por enseñarme.

A todos los miembros del laboratorio. Habéis dejado una gran impronta en mi carrera. Para mí sería un orgullo haberos dado un cuarto de lo que vosotros me habéis dado estos años. Hemos pasado semanas discutiendo sobre lo divino y lo humano, y ha sido un auténtico placer. En un principio, no quería poner nombres, ya que todos habéis contribuido a que esta tesis esté aquí, pero es inevitable hacerlo: Cristina y Manu, ¡gracias por las correcciones!; Elias, gracias por ayudarme con los trámites y Andreas gracias por revisarme toda la parte escrita en inglés. Bruno, gracias por haber confiado en mí estos años. Además quiero agradecer especialmente a Joselín, cómo echo de menos discutir contigo; a Carri, Belén, Dany, Andreas y Gabi: habéis sido –y sois- mucho más que solo compañeros de trabajo.

A mis amigos que siempre están al pie del camión (poner nombres aquí sí que es injusto porque no me voy a acordar de todos, así que si te ha llegado la tesis date por aludido). A esos chavales rumiantes que han venido a jugar, que siempre están al pie del camión, que nunca dejan de escatimar y que no paran de concebir. Sois la auténtica salud, el bienestar, la sal de la vida. Algún día iremos con una pizarra a la Cerca, juntaremos nuestras capacidades y crearemos algo que cambiará el mundo (espero que para bien, no *trolls*). A todos los que habéis venido los fines de semana al laboratorio para que me fuese más ameno trabajar, en especial a JC, un incondicional de mi trabajo.

Quiero hacer una mención especial a Javucho, por explotar mi vena creativa durante las horas y horas que hemos pasado trabajando de monitores (ha sido muy útil estos años en el laboratorio y en las charlas científicas).

Finalmente, no me puedo olvidar de Irene, mi compañera de viaje durante la mayor parte de estos años. Has sido mucho más que un apoyo incondicional. Muchas gracias.

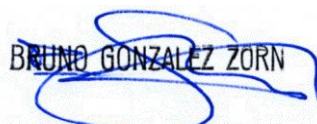


Bruno González Zorn, Profesor Titular del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (UCM),

CERTIFICO:

Que la tesis doctoral titulada “Importancia de los plásmidos ColE1 en la resistencia a antibióticos” que presenta Don Alfonso Santos López, Licenciado en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha sido realizada en las dependencias del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid bajo mi dirección y cumple todas las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

Por ello, cumpliendo la normativa vigente, informo favorablemente para que proceda a su defensa, en Madrid a 6 de noviembre de 2016.


Bruno González Zorn

Fdo. Bruno González Zorn

Índice

ÍNDICE	11
ÍNDICE DE TABLAS	15
ÍNDICE DE FIGURAS	15
ABREVIATURAS	17
RESUMEN	21
ABSTRACT	25
1. INTRODUCCIÓN	31
1.1. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	31
1.1.1. DEFINICIÓN DE ANTIBIÓTICO	31
1.1.2. FUNCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS EN LA NATURALEZA	31
1.1.3. APARICIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA	34
1.1.4. GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	37
1.1.5. PRINCIPALES MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	40
- i) Reducción de la concentración intracelular del antibiótico.	40
- i.a) Inactivación de porinas.	41
- i.b) Modificaciones de las bombas de eflujo.	41
- ii) Inactivación enzimática o modificación del antibiótico.	42
- ii.a) Acetilación, adenilación y fosforilación.	42
- ii.b) Inactivación enzimática.	43
- iii) Modificación, reducción de la expresión o protección de la diana de acción del antibiótico.	44
1.1.6. ÉXITO Y PERSISTENCIA DE LAS RESISTENCIAS	45
- i) Selección directa mediante presencia de antibióticos por encima de la CMI	45
- ii) Selección mediante concentraciones Sub-CMI.	47
- iii) Variabilidad del coste biológico.	49
- iii.a) Resistencias sin coste biológico.	50
- iii.b) Mejoras del fitness debidas a la presencia de genes de resistencia.	51
- iv) Coselección de resistencias.	55
- v) Persistencia de los plásmidos	56
- v.a) La evolución compensatoria en asociaciones plásmido/hospedador	57
- v.b) Epistasis positiva entre plásmidos	60
1.1.7. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN LA ACTUALIDAD	62
1.2. PLÁSMIDOS TIPO COLE1	65

1.2.1. TRANSFERENCIA HORIZONTAL DE GENES	65
1.2.2. PLÁSMIDOS TIPO COLE1	69
1.2.3. REGIÓN CONSERVADA DE LOS PLÁSMIDOS TIPO COLE1	71
1.2.3.1. Replicación de los plásmidos tipo Cole1	73
1.2.3.2. Factores del hospedador que afectan a la replicación	77
1.2.3.3. Movilización de los plásmidos tipo Cole1	79
1.2.4. REGIÓN VARIABLE DE LOS PLÁSMIDOS TIPO COLE1	81
1.2.4.1. Secuencias de inserción	82
1.2.4.2. Determinantes genéticos codificados en la región variable	84
1.2.5. INCOMPATIBILIDAD DE LOS PLÁSMIDOS TIPO COLE1	85
1.2.6. COHABITACIÓN DE PLÁSMIDOS TIPO COLE1 EN LA NATURALEZA	88
1.2.7. ESTABILIDAD DE LOS PLÁSMIDOS TIPO COLE1	91
- i) Sistema preciso de regulación del número de copias.	91
- ii) Sitio activo de partición mediado por la unión de un sistema celular a una región específica del ADN plasmídico.	93
- iii) Sitio específico para resolver la recombinación de los multímeros que se pueden producir como consecuencia de eventos recombinativos.	94
- iv) Sistemas de muerte post-segregación para la bacteria que impide la aparición de células libres de plásmidos.	94
- v) Inhibición temporal de la división celular.	95
2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	101
3. MATERIALES Y MÉTODOS	107
4. RESULTADOS	111
4.1. LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS MEDIADA POR PLÁSMIDOS PEQUEÑOS AUMENTA MEDIANTE EL INCREMENTO EN EL NÚMERO DE COPIAS DE PLÁSMIDOS Y EL <i>FITNESS</i> BACTERIANO.	113
4.1.1. Resumen	113
4.1.2. Introducción	114
4.1.3. Materiales y Métodos	115
Cepas bacterianas, condiciones de cultivo, y determinación de la resistencia a antibióticos.	115
Estimación del <i>Fitness</i> bacteriano	116
Determinación del número de copias	117
Secuenciación masiva	118
Análisis estadístico	119
4.1.4. Resultados y Discusión	119
Diseño Experimental	119
Evolución del <i>fitness</i> bacteriano.	121
Aumento del nivel de resistencia a lo largo del tiempo	122

La ampicilina provoca un aumento del número de copias de pB1000 _____	124
Las mejoras en el fitness bacteriano aumentan el nivel de resistencia en los clones portando plásmidos. _____	126
El número de copias de los plásmidos y el fitness bacteriano contribuyen independientemente al aumento de la resistencia a ampicilina en Rd/pB1000 _____	128
4.1.5. Conclusiones _____	129
4.1.6. Material suplementario _____	130
4.2. UNA MUTACIÓN PUNTUAL ENCONTRADA EN EL PLÁSMIDO pB1000 EN LA NATURALEZA PRODUCE UN AUMENTO REVERSIBLE DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS _____	145
4.2.1. Resumen _____	145
4.2.2. Introducción _____	146
4.2.3. Materiales y Métodos _____	147
Cepas bacterianas, condiciones de cultivos y test de susceptibilidad a antibióticos _____	147
Determinación del Fitness _____	147
Cuantificación del número de copias _____	148
Evolución experimental _____	149
Análisis Estadístico _____	150
4.2.4. Resultados y discusión _____	150
Las variantes de pB1000 actúan como plásmidos independientes pB1000 _____	150
La coexistencia de los plásmidos aumenta el nivel de resistencia pero disminuye el crecimiento bacteriano en ausencia de antibióticos _____	151
Reversión rápida a genotipo de un solo plásmido en ausencia de ampicilina _____	153
4.2.5. Conclusiones _____	154
4.3. LA EVOLUCIÓN COMPENSATORIA FACILITA LA COEXISTENCIA DE PLÁSMIDOS MULTICOPIA _____	157
4.3.2. Resumen _____	157
4.3.2. Introduction _____	158
4.3.3. Materiales y Métodos _____	159
Condiciones de cultivo, cepas bacterianas y determinación del nivel de resistencia _____	159
Estimación del número de copias de plásmidos. _____	159
Mediciones del fitness _____	160
Análisis in silico _____	161
4.3.4. Resultados y Discusión _____	161
La cohabitación de los plásmidos ColE1 en la naturaleza _____	161
El coste biológico de los plásmidos ColE1 tiene un efecto aditivo _____	164
El coste biológico y la expresión fenotípica de los plásmidos ColE1 es proporcional al número de copias _____	166
La adaptación compensatoria favorece la adquisición de nuevos plásmidos pequeños. _____	168

La cohabitación del plásmido en un hospedador compensado no afecta la trayectoria evolutiva.	171
4.3.5. Conclusiones	172
5.DISCUSIÓN	177
5.1. ADAPTACIÓN DE PB1000 AL AMBIENTE: EQUILIBRIO ENTRE EL NÚMERO DE COPIAS Y EL COSTE BIOLÓGICO	177
5.1.1. Modulación del número de copias sin presión antibiótica	177
5.1.2. Modulación del número de copias bajo presión antibiótica	179
5.1.3. Regulación del número de copias mediante la cohabitación de dos variantes de pB1000	180
5.2. EL INCREMENTO DE LA RESISTENCIA A AMPICILINA MEDIADA POR PB1000, ALGO MÁS QUE PLÁSMIDOS	183
5.2.1. Aumento del nivel de resistencia mediante un aumento del número de copias	183
5.2.2. Aumento del nivel de resistencia mediante mejoras en el fitness bacteriano	184
5.3. LA COHABITACIÓN DE PLÁSMIDOS TIPO COLE1 Y LA INFLUENCIA DE LA COMPENSACIÓN	185
5.3.1. Cohabitación plasmídica previa a la compensación del coste biológico	186
5.3.2. Cohabitación plasmídica posterior a la compensación del coste biológico	187
5.4. TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO ERRÓNEO, SOLVENTANDO LA PARADOJA DE LOS PLÁSMIDOS	189
6. CONCLUSIONES	193
7. BIBLIOGRAFÍA	197

Índice de tablas

TABLA 1. PROCESOS ALTERADOS BAJO CONCENTRACIONES SUB-CMI DE ANTIBIÓTICO	32
TABLA 2. ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA ADQUIRIDA	38
TABLA 3. PLÁSMIDOS COLÉ1 DE LA FAMILIA PASTEURELLACEAE COHABITANDO EN LA NATURALEZA	89
TABLA 4. PLÁSMIDOS COLÉ1 DE LA FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE COHABITANDO EN LA NATURALEZA.....	90
TABLA 5. POBLACIONES UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO	116
TABLA 6. RESUMEN DE LAS MUTACIONES ENCONTRADAS EN LAS POBLACIONES	131
TABLA 7. DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES ENCONTRADAS EN LAS POBLACIONES EVOLUCIONADAS EXPERIMENTALMENTE	133
TABLA 8. PLÁSMIDOS UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO.....	159
TABLA 9. CEBADORES UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO	160
TABLA 10. CEPAS UTILIZADAS PARA ANALIZAR LOS EFECTOS EPISTÁTICOS ENTE LOS COLÉ1.....	164
TABLA 11. NÚMERO DE COPIAS, <i>FITNESS</i> Y SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS DE LAS CEPAS UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO...	165
TABLA 12. CEPAS UTILIZADAS EN EL EXPERIMENTO DE ADQUISICIÓN-COMPENSACIÓN	168

Índice de figuras

FIGURA 1. EL RESISTOMA, POTENCIAL RESERVORIO DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.	35
FIGURA 2. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS PRINCIPALES MECANISMOS DE RESISTENCIA.	40
FIGURA 3. COMPARACIÓN DE SELECCIÓN POR ENCIMA Y POR DEBAJO DE LA CMI.	46
FIGURA 4. RATIOS DE CRECIMIENTO COMO FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ANTIBIÓTICO.	48
FIGURA 5. MODOS DE ESTIMACIÓN DEL COSTE BIOLÓGICO.....	50
FIGURA 6. DESARROLLO DE RESISTENCIAS A ANTIBIÓTICOS Y SU EFECTO EN EL <i>FITNESS</i> BACTERIANO.	51
FIGURA 7. TRAYECTORIAS EVOLUTIVAS DE LA APARICIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS.	52
FIGURA 8. EFECTO DE LA EPISTÁSIS EN BACTERIAS MULTIRRESISTENTES.....	54
FIGURA 9. CRONOGRAMA DEL DESARROLLO DE RESISTENCIAS A ANTIBIÓTICOS.	63
FIGURA 10. MECANISMOS DE TRANSFERENCIA HORIZONTAL DE GENES.....	66
FIGURA 11. PLÁSMIDOS COLÉ1 EN LA FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE	70
FIGURA 12. PLÁSMIDOS COLÉ1 EN LA FAMILIA PASTEURELLACEAE.....	72
FIGURA 13. COMPARACIÓN DE LA REGIÓN CONSERVADA DE LOS PLÁSMIDOS TIPO COLÉ1 PROTOTIPO DE LA FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE Y PASTEURELLACEAE	74
FIGURA 14. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA REPLICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS TIPO COLÉ1.....	76
FIGURA 15. ALINEAMIENTO DE MBEA Y MOBA.	80
FIGURA 16. ASOCIACIÓN DE <i>BLA_{ROB-1}</i> E <i>ISAPL1</i> EN PLÁSMIDOS DE LA FAMILIA PASTEURELLACEAE.	83
FIGURA 17. INCOMPATIBILIDAD SEGREGACIONAL	85

FIGURA 18. EFECTOS DE MUTACIONES AFECTANDO A LOS <i>STEAM-LOOPS</i> 1, 2 Y 3 Y SU IMPLICACIÓN EN LA REGULACIÓN CONTRALATERAL.	87
FIGURA 19. NÚMERO DE COPIAS TOTALES DE UN PLÁSMIDO AL FINAL DEL CICLO CELULAR.	92
FIGURA 20. EVOLUCIÓN EXPERIMENTAL SIMULANDO UN TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO CON AMPICILINA.	120
FIGURA 21. <i>FITNESS</i> DE LAS POBLACIONES EVOLUCIONADAS.....	122
FIGURA 22. EVOLUCIÓN DEL NIVEL DE RESISTENCIA A AMPICILINA.	123
FIGURA 23. MODIFICACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DE PB1000 A LO LARGO DEL TIEMPO.....	124
FIGURA 24. MEJORAS EN EL CRECIMIENTO BACTERIANO AUMENTAN EL NIVEL DE RESISTENCIA EN LOS CLONES QUE PORTAN PLÁSMIDOS.	127
FIGURA 25. EL NÚMERO DE COPIAS DE LOS PLÁSMIDOS Y EL <i>FITNESS</i> BACTERIANO DETERMINAN EL NIVEL DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.....	128
FIGURE 26. EFECTOS FENOTÍPICOS Y GENOTÍPICOS DE UN SNP NATURAL HETEROZIGÓTICO EN EL <i>ORIV</i> DE pB1000.....	151
FIGURE 27. FRECUENCIA DE LAS VARIANTES DE LOS PLÁSMIDOS EN LAS POBLACIONES DURANTE LA EVOLUCIÓN EXPERIMENTAL.	152
FIGURE 28. NIVEL DE RESISTENCIA A AMPICILINA Y NÚMERO DE COPIAS DURANTE LA EVOLUCIÓN EXPERIMENTAL	153
FIGURE 29. DISTRIBUCIÓN DEL NÚMERO DE PLÁSMIDOS <i>COLÉ1</i> POR GENOMA.	163
FIGURA 30. <i>FITNESS</i> TEÓRICO Y EMPÍRICO DE LAS 7 CONSTRUCCIONES.	166
FIGURE 31. NÚMERO DE COPIAS DE PLÁSMIDO POR CROMOSOMA.	167
FIGURE 32. ADQUISICIÓN DE NUEVOS PLÁSMIDOS EN UNA BACTERIA PORTANDO UN PLÁSMIDO COMPENSADO	170
FIGURA 33. ADQUISICIÓN DE NUEVOS REPLICONES EN EL HOSPEDADOR EVOLUCIONADO.	171
FIGURA 34. ADQUISICIÓN DE NUEVOS PLÁSMIDOS Y EL EFECTO EN EL <i>FITNESS</i> BACTERIANO	172

Abreviaturas

ADN. Ácido desoxirribonucleico

ANOVA. Análisis de la Varianza

ARN. Ácido ribonucleico

ATP: Adenosin trifosfato

Ca. Del latín *circa*, aproximadamente

CMI. Concentración Mínima Inhibitoria

CMS. Concentración Mínima Selectiva

DE. Desviación Estándar

DO. Densidad Óptica

ϵ . Epistasis

Et al. Del latín, *et allí*, y otros

gl. Grados de libertad

Kb. Kilobase

MFS. *Major Facilitator Superfamily*

NCP. Número de Copias del Plásmido

Nt. Nucleótido

oriT. Origen de transferencia

oriV, Origen de replicación

Pb. Pares de bases

qPCR. PCR cuantitativa

s. Coeficiente de selección

SEM. Error Estándar de las Medias

SNP. *Single nucleotide polymorphism*

Sub-CMI. Concentración por debajo de la CMI

THG. Transferencia Horizontal de Genes.

UFC. Unidad Formadora de Colonia

w. *Fitness*

Resumen

Resumen

Los antibióticos han salvado millones de vidas desde que en la década de 1940 se introdujeran en la práctica clínica. Desafortunadamente debido a la rápida aparición de resistencias, su fácil diseminación y la dificultad de su eliminación una vez que se han establecido en la población, nos encontramos ante un grave problema tanto para la salud humana como para la sanidad animal. Actualmente, se producen en torno a 700.000 muertes al año por bacterias resistentes a antibióticos, y se calcula que para 2050 se superarán las 10 millones asociadas a la resistencia a antibióticos.

Los plásmidos juegan un papel determinante en la diseminación de la resistencia a antibióticos. Los plásmidos son moléculas de ADN que replican de forma independiente al cromosoma bacteriano y que tienen la capacidad de movilizar genes horizontalmente. En concreto, los plásmidos tipo ColE1 tienen una gran importancia en la resistencia a antibióticos. Estos pequeños replicones portan algunos determinantes de resistencia a los antibióticos más relevantes en la práctica clínica. Además son capaces de coexistir en una misma bacteria generando multirresistencia a varios antibióticos.

Cuando una bacteria adquiere resistencia a antibióticos mediante la transferencia horizontal de un plásmido, compromete su crecimiento debido al coste biológico asociado al replicón. Esto genera que, en ausencia de presión selectiva, las bacterias que porten plásmidos serán menos competitivas comparado con las bacterias libres de replicones. Sin embargo, en presencia de antibióticos, las bacterias portando plásmidos serán seleccionadas en la población. La adaptación plásmido/hospedador es, por tanto, crucial para entender la presencia de los plásmidos portadores de resistencia en las poblaciones bacterianas.

En esta tesis doctoral hemos analizado la adaptación del plásmido tipo ColE1 pB1000, que confiere alto fenotipo de resistencia a β -lactámicos, a su hospedador natural, el patógeno humano *Haemophilus influenzae*. Mediante evolución experimental de la cepa *H. influenzae* RdKW20 portando pB1000, hemos estudiado las adaptaciones plásmido/hospedador en presencia y ausencia de ampicilina. En primer lugar hemos descrito cómo la presencia de ampicilina en el medio genera un aumento del número de copias de pB1000, que se traduce en un aumento del fenotipo de resistencia a ampicilina. En segundo lugar hemos encontrado cómo el coste biológico del replicón se

compensa tras 100 generaciones de evolución en ausencia de antibiótico en el medio. Finalmente, hemos visto que tras las evoluciones experimentales (en ausencia y en presencia de antibióticos) las bacterias portando pB1000 mejoraron su crecimiento comparado con la cepa ancestral. Por primera vez, hemos descrito cómo dichas mejoras en el crecimiento producidas por la coevolución bacteria/plásmido incrementan el nivel de resistencia a ampicilina pese a la reducción del número de copias plasmídico.

En el segundo trabajo hemos estudiado cómo una mutación en el origen de replicación de pB1000 produce un aumento transitorio del fenotipo de resistencia causado por este plásmido. En una cepa de *Pasteurella multocida* que mostraba alto nivel de resistencia a ampicilina encontramos dos variantes de pB1000 coexistiendo, diferenciadas solamente por una mutación en el nucleótido 3880. Este polimorfismo genera dos plásmidos independientes que son capaces de replicar en la misma célula simultáneamente, manteniendo cada uno su nivel de copias. Por tanto, cuando ambas variantes están en la célula, el número de copias totales de pB1000 se incrementa, aumentando el nivel de resistencia a ampicilina. La evolución experimental de la cepa *H. influenzae* RdKW20 portando ambas variantes de pB1000 en ausencia de antibióticos, conlleva la pérdida de una de las dos variantes en el 80% de las líneas evolucionadas, reduciendo consecuentemente el número de copias de plásmidos (y el nivel de resistencia a ampicilina) y por tanto el coste asociado al plásmido. Sin embargo, en presencia de ampicilina en la evolución experimental, la cepa es capaz de conservar ambas variantes, manteniendo de tal modo un elevado nivel de resistencia a ampicilina.

Finalmente, numerosos trabajos muestran que la cohabitación de plásmidos tipo ColE1 es muy relevante en la naturaleza, a pesar del coste biológico asociado a estos replicones. En este trabajo hemos analizado dos hipótesis que podrían explicar la cohabitación de los plásmidos ColE1 en ausencia de antibióticos: i) el coste de los plásmidos se reduce en la cohabitación gracias a interacciones epistáticas entre los replicones y ii) una vez que se compense el coste biológico de un replicón, la adquisición de otros plásmidos tipo ColE1 no tendrá efectos en el *fitness* bacteriano. Para estudiar ambas hipótesis utilizamos los plásmidos tipo ColE1 pB1000; pB1005 (que genera fenotipo resistencia a estreptomicina) y pB1006 (que confiere resistencia a tetraciclina), y la cepa *H. influenzae* RdKW20. Cuando los tres plásmidos son adquiridos simultáneamente por la bacteria no aparecen interacciones entre los

replicones, es decir, cada plásmido mantiene el mismo número de copias, genera el mismo fenotipo de resistencia e impone el mismo coste biológico que cuando habitan la célula individualmente. Por tanto, las interacciones epistáticas no pueden explicar la cohabitación de los replicones tipo ColE1 en la naturaleza. Sin embargo, con la segunda hipótesis sí fuimos capaces de explicar la cohabitación de los plásmidos ColE1 en la naturaleza: una vez producida la compensación del coste biológico de pB1000, la adquisición de pB1005 y pB1006 (individualmente o a la vez) no supuso ningún impacto en el *fitness* de la cepa.

En conclusión, en esta tesis doctoral nos hemos centrado en estudiar la adaptación de los plásmidos tipo ColE1 a sus hospedadores, y en cómo los tratamientos antimicrobianos influyen en esta adaptación. Con ello entendemos mejor la elevada prevalencia de estos plásmidos en la naturaleza, y por tanto, su importancia en la resistencia a antibióticos.

Abstract

Since their introduction in the 1940's, antibiotics have saved millions of lives. Unfortunately, due to the rapid emergence and dissemination of resistance determinants combined with the difficulty of combatting resistance genes that have already been established within bacterial populations, we are now facing a grave problem both in human and animal health.

Plasmids play a key role in the dissemination of antibiotic resistance genes. Plasmids are DNA molecules that replicate independently of the bacterial chromosome and have the ability to mobilize genes horizontally. ColE1-like plasmids, in particular, have a substantial impact on antibiotic resistance. These small replicons bear antibiotic resistance determinants against the most clinically relevant antibiotics. Furthermore, they are capable of coexisting in a single cell generating multiresistance to various antibiotics.

When a bacterium acquires antibiotic resistance via plasmid mediated horizontal gene transfer, the bacterium compromises its fitness due to the biological cost incurred by the replicon. The biological cost, in absence of selective pressure, renders the bacteria bearing plasmids less competitive compared to the replicon-free bacteria. However, in the presence of antibiotic pressure, bacteria bearing plasmids will be selected for in the population. Elucidating the process of plasmid/host adaptation is therefore crucial to understand the presence of resistance-bearing plasmids in the bacterial populations.

In this PhD dissertation, we have analyzed the adaptation of pB1000, a ColE1-like plasmid that confers a high-level resistance phenotype to β -lactams to its natural host, *Haemophilus influenzae*. By experimental evolution of the *H. influenzae* strain RdKW20 bearing pB1000, we have studied the plasmid/host adaptations in both the presence and absence of ampicillin. First we have described how the presence of ampicillin in the environment induces an augmentation of the plasmid copy number, which results in a higher resistance phenotype to ampicillin. Second, we have found that the biological cost of pB1000 is compensated after 100 generations of evolution in the presence or absence of antibiotics in the broth. Finally, we have seen that experimental evolutions (in the presence or absence of antibiotic) of bacteria bearing

pB1000 increase their fitness as compared to the ancestral strain. For the first time, we have described how improvements in fitness as a result of the plasmid/host coevolution enhance the resistance level to ampicillin.

In the second study of this work we have analyzed how a single mutation in the pB1000 origin of replication induces a transient increase in the resistance level mediated by the plasmid. In a *Pasteurella multocida* strain bearing high-level resistance to ampicillin, we found two coexisting variants of pB1000. Both pB1000 variants are differentiated by only one SNP of the nucleotide 3880. This polymorphism generates two independent plasmids capable of replicating within the same cell simultaneously, while maintaining their own plasmid copy number. As such, when both variants cohabit the same cell, pB1000's total plasmid copy number is incremented, which then augments the resistance level to ampicillin. The experimental evolution of *H. influenzae* RdKW20 bearing both pB1000 variants in the absence of antibiotic pressure leads to the loss of one of the variants in 80% of the propagated lines, whereby reducing the resistance level and the plasmid copy number of the replicon. However, in the presence of ampicillin, the strain is capable of preserving both variants, thus maintaining the elevated resistance level to ampicillin.

Finally, despite the biological cost associated with the replicons, ColE1-like cohabitation is very significant in nature. In this work, we have analysed two hypotheses to explain ColE1-like cohabitation: i) epistatic interactions among the plasmids reduce the biological cost of the replicons during cohabitation or ii) once the biological cost of a replicon has been compensated, the acquisition of another ColE1-like plasmid will not affect bacterial fitness. To study both theories, we have developed a model using the *H. influenzae* RdKW20 strain and the ColE-like plasmids pB1000, pB1005 and pB1006 that confer resistance to ampicillin, streptomycin and tetracycline respectively. When both plasmids have been acquired by the bacteria, there are no epistatic interactions among the replicons: each plasmid independently maintains its plasmid copy number, confers the same resistance level and imposes the same biological cost whether inhabiting the cell alone or cohabitating. As such epistatic interactions do not explain the phenomena of plasmid cohabitation. However, with the second hypothesis we were able to explain ColE1-like cohabitation: once compensatory evolution compensates the biological cost of pB1000, the acquisition of pB1005 and pB1006 has no impact on the fitness of the strain.

In conclusion, in this PhD dissertation we have focused our studies on the adaptation of ColE1-like plasmid to their hosts, and how antibiotic exposure treatments influence this adaptation. With this dissertation we gain a better understanding regarding the prevalence of this plasmid in nature, and as such, their importance in the antibiotic resistance.

Introducción

1. Introducción

1.1. Resistencia a antibióticos

1.1.1. Definición de antibiótico

Según la definición acuñada por Selman Waksman en 1942, los antibióticos son agentes antimicrobianos producidos por una gran variedad de microorganismos como los hongos filamentosos o mohos, levaduras, actinomicetos y bacterias (Waksman y Woodruff 1942). El término antibiótico ha sido utilizado para cualquier producto de origen microbiano que, a bajas concentraciones, inhibe o elimina a los microorganismos susceptibles. Con esta definición, el término diferenciaría entre un agente como la penicilina, producida por un hongo, de los antibióticos sintéticos producidos por el hombre, como por ejemplo las sulfonamidas. La definición de antibiótico tuvo que ser revisada cuando las penicilinas y otros antibióticos naturales fueron modificados o sintetizados *de novo* en el laboratorio. Actualmente, el término antibiótico es utilizado más comúnmente para referirse a cualquier agente antimicrobiano efectivo a bajas concentraciones, ya sea natural, semi-sintético o completamente sintético (Singleton y Sainsbury 2006). Los antibióticos pueden inhibir el crecimiento bacteriano (antibióticos bacteriostáticos) o provocar la muerte bacteriana (antibióticos bactericidas) mediante la interacción específica con una diana bacteriana. La diana del antibiótico puede ser una enzima esencial implicada en procesos celulares, como por ejemplo la síntesis de proteínas, la biosíntesis de la pared celular, la transcripción o la replicación del ADN (Allen, Donato *et al.* 2010).

1.1.2. Función de los antibióticos en la naturaleza

La mayor parte de los antibióticos utilizados para el tratamiento de infecciones son sintetizados por una variedad de especies de bacterias del suelo (particularmente *Streptomyces* del filo Actinobacteria) y por hongos (Allen, Donato *et al.* 2010). Se estima que la producción natural de antibióticos comenzó entre el Proterozoico y el Fanerozoico en un rango comprendido entre 2.000 y 40 millones de años atrás (D'Costa, King *et al.* 2011).

Tabla 1. Procesos alterados bajo concentraciones Sub-CMI de antibiótico (Andersson y Hughes 2014)

Procesos alterados	Diana ^a	Antibiótico involucrado ^b	Especie bacteriana ^{c,d}
Expresión genética	ADN	CIP, FUR, NOR, OFL, SXT, TRM	<i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i>
	ARN	RIF	<i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. enterica</i>
	Proteínas	AZI, CHL, CLI, DAP, ERY, FLO, GEN, KAN, LIN, PUR, TET	<i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. enterica</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i>
	Pared celular	AMP, AMX, BAC, CAZ, CEC, CXM, PEN, POL, TEC, VAN	<i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i>
	Membrana	CER	<i>S. aureus</i>
Inducción de Sistema SOS	ADN	CIP, FUR, LEV, NOR, OFL, TRM	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>
	Pared celular	B-lactámicos	<i>E. coli</i>
Virulencia	ADN	CIP, TRM	<i>S. aureus</i>
	Proteína	AZO, CLI, LIN	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>
Biofilm	Proteína	AZI, CIP, TGC, TOB	<i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>
<i>Quorum sensing</i>	Proteína	AZI	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i>
Conjugación	Proteína	TET	<i>B. subtilis</i> , <i>L. monocytogenes</i>
	Pared celular	B-lactámicos	<i>S. aureus</i>
Formación del flagelo	Proteína	MUP	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mirabilis</i>
Hemólisis	Pared celular	CEF	<i>S. aureus</i>

^a ADN representa la replicación, superenrollamiento o síntesis de precursores de nucleótidos; ARN representa a la ARN polimerasa; proteína representa a la maquinaria de la síntesis proteica, principalmente el ribosoma; pared celular representa la síntesis del peptidoglicano; y membrana representa la membrana celular

^b AMP, ampicilina; AMX, amoxicilina; AZI, azitromicina; BAC, bacitracina; CAZ, ceftazidima; CEC, cefepima; CEF, cefotaxima; CER, cerulenina; CHL, cloranfenicol; CIP, ciprofloxacina; CLI, clindamicina; CXM, cefuroxima; DAP, daptomicina; ERY, eritromicina; FLO, florfenicol; FUR, furazolidina; GEN, gentamicina; KAN, kanamicina; LEV, levofloxacina; LIN, linezolid; MUP, mupirocina; NOR, norfloxacina; OFL, ofloxacina; PEN, penicilina; POL, polimixina; PUR, puromicina; RIF, rifampicina; SXT, cotrimoxazol; TEC, teicoplanina; TET, tetraciclina; TGC, tigeciclina; TOB, tobramicina; TRM, trimetoprim; VAN, vancomicina

^c *B. subtilis*, *Bacillus subtilis*; *E. coli*, *Escherichia coli*; *E. faecalis*, *Enterococcus faecalis*; *L. monocytogenes*, *Lysteria monocytogenes*; *P. mirabilis*, *Proteus mirabilis*; *S. aureus*, *Staphylococcus aureus*; *S. enterica*, *Salmonella enterica*; *S. pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*; *S. pyogenes*, *Streptococcus pyogenes*.

^d Referencias en Andersson y Hughes 2014

En la naturaleza los antibióticos, así como otros elementos tóxicos, tienen un efecto hormético: a altas concentraciones son tóxicos mientras que a bajas concentraciones inducen respuestas en el organismo diana que son beneficiosas para el receptor (Davies, Spiegelman *et al.* 2006). Dependiendo de la concentración en la que se encuentren en el ambiente, los antibióticos actuarán como inhibidores de competidores del nicho o señales de comunicación celular en comunidades microbianas. La concentración mínima que inhibe el crecimiento de una población sensible (CMI) se define como la concentración más baja del antibiótico –establecida bajo condiciones *in vitro*- que impide el crecimiento visible de la población. Una vez superada la CMI los antibióticos inhiben el crecimiento de una población diana (Mouton, Brown *et al.* 2012).

En determinados ambientes, la concentración de antibióticos superan la CMI inhibiendo el crecimiento bacteriano (Larsson, de Pedro *et al.* 2007, Li, Yang *et al.* 2008). Sin embargo, en gran cantidad de ambientes naturales, así como en los tejidos humanos, los antibióticos se encuentran habitualmente en concentraciones subinhibitorias (Sub-CMI) (Baquero, Negri *et al.* 1998, Davies, Spiegelman *et al.* 2006, Martinez, Fajardo *et al.* 2009, Fram y Belitz 2011, Davies 2013, Jiang, Hu *et al.* 2013, Khan, Berglund *et al.* 2013). La concentración Sub-CMI es la concentración en la cual la bacteria sensible puede crecer, aunque a veces está comprometido su crecimiento en comparación con su crecimiento en ausencia del mismo antibiótico (Andersson y Hughes 2014). A concentraciones subinhibitorias los antibióticos actúan como señalizadores, generando cascadas proteínicas que afectan al comportamiento celular (Davies, Spiegelman *et al.* 2006, Linares, Gustafsson *et al.* 2006, Andersson y Hughes 2014). Incluso se ha especulado sobre su función como fuente de carbono en las comunidades microbianas (Dantas, Sommer *et al.* 2008, Walsh, Amyes *et al.* 2013). A bajas concentraciones los antibióticos inducen cambios transcripcionales específicos que son independientes del estrés bacteriano, y pueden tener consecuencias positivas modulando las interacciones dentro de las comunidades microbianas (Goh, Yim *et al.* 2002, Linares, Gustafsson *et al.* 2006). En la Tabla 1, se resumen las alteraciones producidas por concentraciones Sub-CMI en diversos procesos bacterianos.

1.1.3. Aparición de mecanismos de resistencia

Independientemente del papel que juegue el antibiótico en el nicho (molécula implicada en la señalización celular o inhibidor de competidores) la síntesis y difusión de los compuestos antibióticos implica que gran cantidad de bacterias han sido expuestas durante numerosas generaciones a los antibióticos, y como consecuencia, se han seleccionado gran cantidad de mecanismos de resistencia (Andersson 2016). La resistencia a antibióticos no es un evento reciente. Se ha demostrado la presencia de genes de resistencia a antibióticos β -lactámicos, tetraciclinas y glucopéptidos en sedimentos de más 30.000 años de antigüedad (D'Costa, King *et al.* 2011). Análisis metagenómicos de diferentes muestras ambientales como el suelo, sedimentos oceánicos o ambientes previos a la era pre-antibiótica (momento en el que se introdujeron los antibióticos en la clínica) han demostrado la presencia de secuencias de ADN altamente similares a las conocidas actualmente por conferir fenotipo de resistencia a antibióticos, que pueden actuar de reservorios y que potencialmente pueden ser movilizadas entre la comunidad microbiana (Song, Jeon *et al.* 2005, D'Costa, McGrann *et al.* 2006, Demaneche, Sanguin *et al.* 2008, Allen, Donato *et al.* 2010, D'Costa, King *et al.* 2011). Aunque se necesitan más estudios para poder elucidar el papel original de los resistomas encontrados en la naturaleza (Davies 2013), dada la ubiquidad de los determinantes de resistencia en todos los ambientes, independientemente de su función original, encontramos que los genes de resistencia y los antibióticos son mecanismos fundamentales para la gran mayoría de las bacterias (Nesme y Simonet 2015). El resistoma es el conjunto de genes de resistencia y precursores de los genes de resistencia que están presentes en todas las bacterias patógenas y no patógenas de una muestra estudiada (Andersson 2016), y está compuesto por (Figura 1): i) genes precursores, es decir genes con poca afinidad por las moléculas antibióticas, ii) genes de resistencia crípticos, que son aquellos que no generan fenotipo de resistencia –o generan fenotipo de resistencia muy bajo- en el hospedador, y iii) genes de resistencia clínicos –como los que codifican las β -lactamasas- que confieren alto fenotipo de resistencia a antibióticos (Wright 2007). Para entender el papel completo del resistoma y los problemas derivados de él en la práctica clínica, es necesario una aproximación global e integradora que incluya las condiciones ambientales, el enclave genético, así como las singularidades clínicas (Nesme y Simonet 2015, Chakradhar 2016).

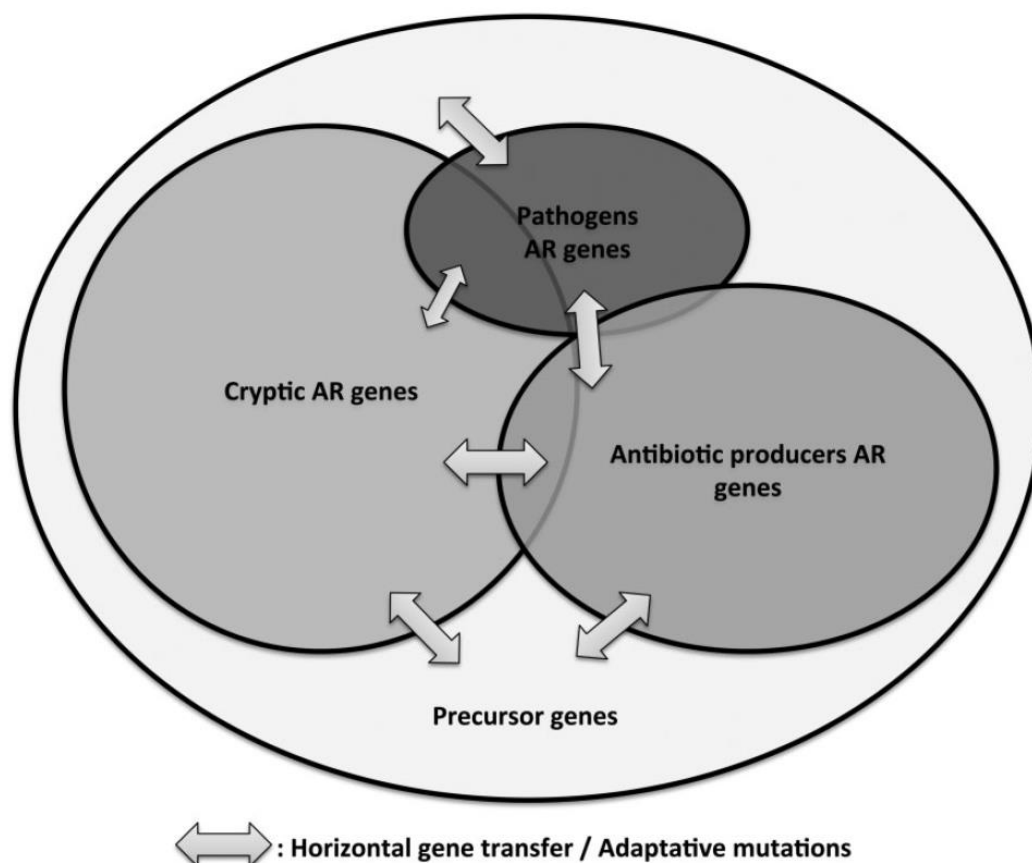


Figura 1. El resistoma, potencial reservorio de resistencia a antibióticos.

El resistoma son todos los genes codificando proteínas relacionadas con la resistencia a antibióticos, englobando genes de resistencia problemáticos identificados en bacterias patógenas, genes de resistencia de bacterias productoras de antibióticos, y genes crípticos de resistencia, es decir, genes con poca afinidad a antibióticos que no tienen por qué estar expresados pero pueden conferir resistencia en otro contexto ambiental. Los genes pueden cambiar de estatus a través de transferencia horizontal de genes, o mediante mutaciones puntuales o recombinación. Figura obtenida de Nesme y Simonet 2015.

Los genes de producción de antibióticos en la naturaleza están asociados con genes que codifican para procesos de auto-protección. La mayor parte de las bacterias productoras de antibiótico portan genes que codifican determinantes de resistencia a los antibióticos que ellas mismas producen (Hopwood 2007), y esos genes normalmente se encuentran en los mismos *clusters* que codifican las proteínas implicadas en la producción y síntesis de los antibióticos. Uno de los primeros trabajos que relacionó la presencia de mecanismos de resistencia en bacterias productoras de antibióticos fue el de Benveniste *et al.* en 1973 (Benveniste y Davies 1973). *Streptomyces kanamyceticus*, productor de kanamicina, y *S. spectabilis*, productor de gentamicina, portan enzimas modificadoras de aminoglucósidos. *S. kanamyceticus* codifica una enzima que acetila el

grupo 6'-amino de las kanamicinas A y B y de la gentamicina, mientras que *S. spectabilis* expresa una enzima que acetila el grupo 2'-amino del anillo de hexosa de la gentamicina C. Del mismo modo *S. coelicor*, productor del antibiótico actinorhodino, codifica en el mismo *cluster* implicado en la producción del antibiótico los genes *actR* y *actA*, represor y bomba de eflujo respectivamente, que se encargan de expulsar el antibiótico fuera de la célula (Tahlan, Ahn *et al.* 2007).

No obstante, el desarrollo de resistencias a antibióticos no siempre está asociado a la producción de antibióticos (Nodwell 2007). Por ejemplo *S. coelicor* codifica una proteína que es similar en secuencia al mecanismo que confiere resistencia a vancomicina (Hong, Hutchings *et al.* 2004). Sorprendentemente, *S. coelicor* no produce ni vancomicina ni ningún antibiótico similar. A su vez, en *S. coelicor* se encuentran genes de resistencia a antibióticos completamente sintéticos a los que presumiblemente nunca ha sido expuesto en la naturaleza (Wright 2007).

Como hemos visto, los antibióticos pueden cumplir funciones independientes de la inhibición en algunos ambientes determinados. Esto implica que algunos genes de resistencia a antibióticos puedan haber tenido roles diferentes a la resistencia en sus ambientes originarios, y solo la aparición de mutaciones o el movimiento a ambientes con presión antibiótica haga que desarrollen la función defensiva (Martinez 2008). Ciertas clases de bombas de eflujo, como por ejemplo las bombas de eflujo de multirresistencia, ofrecen mecanismos generales de resistencia a las bacterias, tales como defensa contra toxinas o metales pesados y/o contribuyen a la virulencia, al mantenimiento de la homeostasis y a la detoxificación de metabolitos intracelulares (Martinez, Sanchez *et al.* 2009, Davies y Davies 2010). Para algunas bombas que generan fenotipo de multirresistencia, la resistencia a antibióticos parece una función asociada diferente a su primer rol en la naturaleza. *Shewanella oneidensis*, una bacteria que vive en los sedimentos, porta una bomba, *mexF*, que en su ambiente original no está relacionada con la resistencia a antimicrobianos, mejorando simplemente el *fitness* bacteriano –representado como los efectos combinados de las propiedades fenotípicas sobre la capacidad para sobrevivir y reproducirse de un genotipo específico en un ambiente determinado (Lenski 1991)-, pero que, cuando es expresada en cepas laboratoriales, confiere resistencia a cloranfenicol y a tetraciclina (Groh, Luo *et al.* 2007).

Otro ejemplo es el de la enzima 2'N-acetiltransferasa que modifica el peptidoglicano de la bacteria *Providencia stuartii*. El peptidoglicano de *P. stuartii* es similar al antibiótico gentamicina, y dada esta semejanza, la acetiltransferasa es capaz de modificar tanto al peptidoglicano como a la gentamicina (Macinga y Rather 1999). Mediante transferencia horizontal de genes (THG) se puede movilizar esta enzima a ambientes diferentes de su contexto original donde su única función puede ser la de generar resistencia a la gentamicina (Franklin y Clarke 2001).

También se ha propuesto que la función original de las β -lactamasas no fuera la degradación del anillo β -lactámico de los antibióticos β -láctamicos, sino que su función original estaba asociada a la síntesis del peptidoglicano y que su actividad contra los antibióticos β -lactámicos no ha sido más que una modificación de su función original (Aminov 2009, Martinez, Fajardo *et al.* 2009).

1.1.4. Genética de la resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos puede ser clasificada globalmente como intrínseca o adquirida. Cuando la resistencia se debe a mecanismos presentes en todas las cepas de una especie bacteriana se trata de resistencia intrínseca, de manera que los mecanismos de resistencia se encuentran codificados en el cromosoma del hospedador (Aleksun y Levy 2007). La resistencia adquirida es aquella obtenida por un evento mutacional, de recombinación o de transferencia horizontal mediante plásmidos, bacteriófagos, transposones y otros elementos genéticos móviles (Martinez, Fajardo *et al.* 2009) (Tabla 2). El resistoma tiene la capacidad de ser transferido intra e inter-especies, y producir fenotipo de resistencia que cualquier patógeno humano o animal podría exhibir. La mayor parte de los problemas surgidos desde que se comenzaron a utilizar los antibióticos en la práctica clínica son consecuencia de la adquisición vía THG de determinantes de resistencia preexistentes en la naturaleza.

Tabla 2. Elementos genéticos móviles implicados en la resistencia adquirida
(Alekshun y Levy 2007)

Elemento genético	Características Generales	Determinantes de resistencia ^a
Plásmido	Tamaño variable (1 > 100 kb), capaces de conjugar y /o movilizarse	Múltiples determinantes de resistencia
Secuencias de Inserción	Menores de 2.5 kb, contienen transposasas	IS1, IS3, IS4...
Transposones compuestos	Flanqueados por secuencias de inserción	Tn5: KAN, BLEO y STR
Transposones complejos	Mayores de 5 kb, codifica una transposasa y una recombinasa flanqueado por pequeñas repeticiones invertidas	Tn1, Tn3: β-lactamasas Tn7: TMP, STR, SPC
Transposones conjugativos	Promueven auto-transferencia lateral	Tn916: TET, MINO Tn1545: TET, MINO, ERY, KAN
Bacteriófagos transponibles	Virus bacterianos que pueden insertarse en el cromosoma	Mu
Otros elementos transponibles	Transposones diferentes a los compuestos, complejos o conjugativos	Tn4: AMP, STR, SUL Tn1691: GEN, STR, SUL, CHL
Integrones	Facilitan la adquisición y diseminación de casetes de genes. Codifican una integrasa, sitio de unión <i>att</i> , y elementos transcripcionales que producen la expresión de múltiples determinantes de resistencia	Existen 4 clases. TMP, STR, carbapenemas...

^a AMP, ampicilina; BLEO, bleomicina; CHL, cloranfenicol; ERY, eritromicina; FUS, ácido fusídico; KAN, kanamicina; MINO, minociclina; SPC, spectinomycin; STR, estreptomycin, SUL, sulfonamida; TET, tetraciclina; TMP, trimetoprim.

En el caso de la adquisición de resistencias mediante mutaciones, el proceso es relativamente sencillo: requiere solamente una mutación que genere resistencia en un gen presente en la bacteria y suficiente selección —en general presión antibiótica— que favorezca a los mutantes resistentes frente a los sensibles (para más información ver la revisión (Martinez y Baquero 2000)). Una vez que el mutante emerge, el antibiótico elimina a la población sensible y la bacteria resistente predomina. En numerosas ocasiones, las mutaciones tienen un coste biológico elevado y solamente se mantienen en la población si existe antibiótico en el medio (Vogwill y MacLean 2015).

La presencia de elementos móviles en bacterias patógenas supone un problema debido a su papel en la THG, proceso por el que las bacterias pueden adquirir ácidos nucleicos del ambiente. La mayor parte de los genes de resistencia en patógenos hospitalarios se encuentran codificados en plásmidos que contienen transposones,

integrone o secuencias de inserción que podrán ser movilizados y transferidos a otras bacterias de la misma o diferente especie (Allen, Donato *et al.* 2010). Son precisos varios requisitos para que un determinante de resistencia pueda ser transferido mediante THG: i) el mecanismo que genere resistencia debe estar presente en una bacteria donadora, ii) la presencia de un mecanismo genético que permita la transferencia horizontal, iii) tiene que haber una oportunidad ecológica para que se produzca la transferencia entre el donador y el receptor (por ejemplo, en la conjugación se necesita el contacto directo entre ambas bacterias), iv) el gen adquirido tiene que ser adecuadamente expresado fenotípicamente en la célula receptora, y v) debe haber una gran selección, generalmente una concentración alta de antibiótico, que favorezca al organismo resistente frente al organismo sensible, ya que en general los determinantes de resistencia tienen un coste biológico (Andersson 2016). La THG será ampliamente introducida en el apartado 2.1 “Transferencia horizontal de genes”.

A pesar de la relativa facilidad con la que las bacterias se vuelven resistentes mediante mutaciones, la THG es la ruta predominante de generación de resistencia a antibióticos, probablemente debido a que mediante un único evento se pueden adquirir diferentes determinantes de resistencia procedentes del resistoma de la comunidad (Munita y Arias 2016) y a que el coste biológico de las resistencias mediadas por plásmidos es relativamente inferior a la carga metabólica asociada a la resistencia causada por mutaciones cromosómicas (Vogwill y MacLean 2015). La resistencia mediada por mutaciones habitualmente produce un bajo nivel de resistencia y se necesitan varios eventos mutacionales para producir un nivel clínicamente relevante de resistencia a antibióticos (Aleksun y Levy 2007). Un caso excepcional es el caso de *Mycobacterium tuberculosis*, en el que todos los mecanismos de resistencia conocidos son consecuencia de mutaciones. Estas mutaciones puntuales pueden producir alto nivel de resistencia, como por ejemplo, la resistencia a estreptomina y a rifampicina que aparecen como consecuencia de mutaciones en la proteína ribosomal S12 y la subunidad β de la ARN polimerasas respectivamente (Andersson 2016). Aunque *Mycobacterium* tiene plásmidos conjugativos y bacteriófagos, no parecen estar asociados con la aparición de la resistencia a antibióticos en esta bacteria (Davies 2013).

1.1.5. Principales mecanismos de resistencia a antibióticos

Los principales mecanismos de resistencia se pueden agrupar en tres grandes clases (Gonzalez Zorn y Escudero 2012) (Figura 2). Este apartado no pretende ser una revisión de todos los mecanismos de resistencia descritos, sino una breve introducción a los principales mecanismos de resistencia, ilustrados con algún ejemplo, y remarcando las resistencias encontradas en Pasteurellaceae y aquellos genes importantes para la tesis doctoral. Para más información ver las revisiones actuales descritas en la bibliografía (Blair, Webber *et al.* 2015, Munita y Arias 2016, Schwarz, Loeffler *et al.* 2016)]:

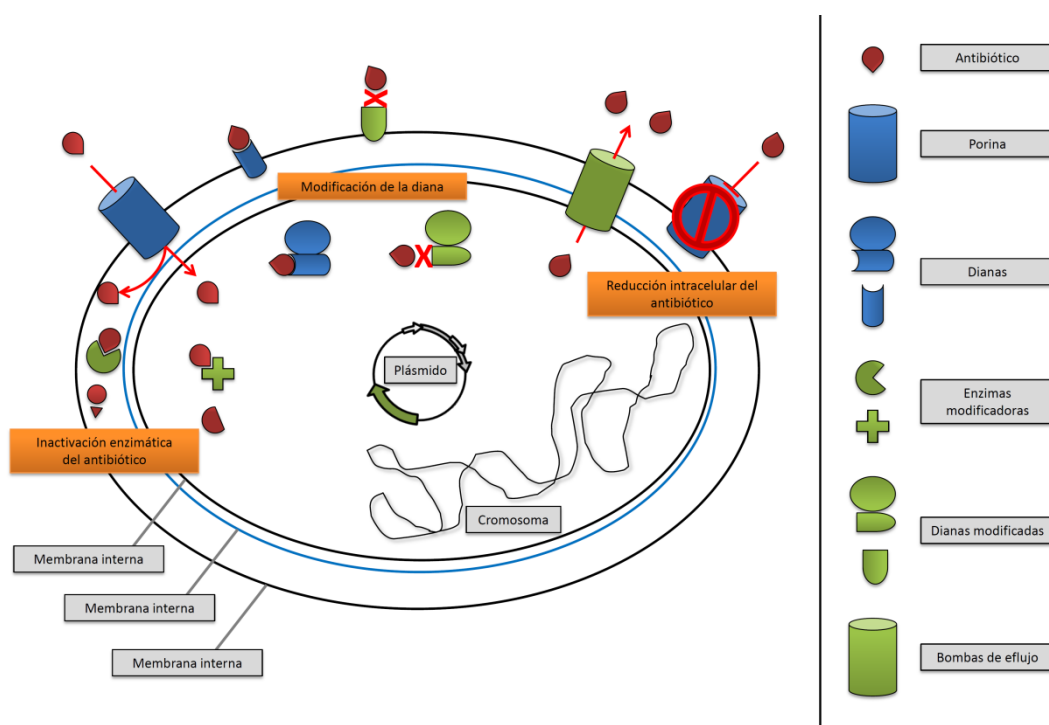


Figura 2. Representación esquemática de los principales mecanismos de resistencia.

La entrada del antibiótico en la célula, la unión a la(s) diana(s), y los diferentes mecanismos de resistencia están detallados en la parte de la izquierda. La leyenda se encuentra detallada en la parte de la derecha. Esquema modificado de (Gonzalez Zorn y Escudero 2012).

- i) Reducción de la concentración intracelular del antibiótico.

En los casos en los que los antimicrobianos necesiten encontrarse en el interior de la bacteria (o al menos en el espacio periplásmico de Gram-negativos), mediante la inactivación de las porinas (impidiendo así su entrada en la célula) o a través de bombas de eflujo se reduce la concentración intracelular

del antibiótico. Este mecanismo es realmente importante en bacterias Gram-negativas, ya que constituyen la primera línea de defensa frente a la penetración de múltiples compuestos tóxicos (Munita y Arias 2016) (Tabla 3).

- *i.a) Inactivación de porinas.*

Ciertas proteínas de membrana llamadas porinas, facilitan la entrada de agentes antimicrobianos dentro de la célula. OmpF y OmpD se encuentran involucradas en la adquisición de tetraciclinas, β -lactámicos y cloranfenicol en *Escherichia coli* y carbapenemas en *Pseudomonas Aeruginosa* (Schwarz, Loeffler *et al.* 2016). La reducción del flujo de antibióticos, suele producirse como consecuencia de la disminución en la expresión de las porinas, la modificación estructural de la proteína o incluso delección funcional de la porina (Munita y Arias 2016).

- *i.b) Modificaciones de las bombas de eflujo.*

El aumento del eflujo del antibiótico que ha entrado en la célula aumenta la resistencia a antibióticos. Existen transportadores responsables del metabolismo bacteriano y de la expulsión de moléculas tóxicas que están presentes en prácticamente todas las bacterias que son responsables de multirresistencia a antibióticos (Martinez, Sanchez *et al.* 2009, Hernando-Amado, Blanco *et al.* 2016). Por ejemplo los transportadores AcrAB-TolC y MexAB-OprM en *E. coli* y en *P. aeruginosa* pueden exportar entre otros cloranfenicol, fluoroquinolonas, tetraciclinas, β -lactámicos y macrólidos. En *Haemophilus influenzae* se han descrito bombas tipo AcrAB implicadas en la resistencia a macrólidos (Bogdanovich, Bozdogan *et al.* 2006) y mutaciones e inserciones en el gen *acrR* que incrementan la resistencia a antibióticos β -lactámicos (Kaczmarek, Gootz *et al.* 2004).

Los transportadores específicos relacionados con la resistencia antibiótica habitualmente corresponden a las siguientes familias: i) *Major facilitator superfamily* (MFS), ii) ABC, casetes de unión a ATP o iii) familia de extrusión de multirresistencia y de compuestos tóxicos (Schwarz, Loeffler *et al.* 2016). La resistencia a tetraciclinas es uno de los ejemplos clásicos de resistencia mediada por bombas de eflujo, donde las bombas Tet –que pertenecen a la familia MFS-

expulsan antibióticos utilizando protones como fuente de energía. Existen más de 20 genes *tet*, la mayoría descritos en elementos genéticos móviles (<http://faculty.washington.edu/marilynr/>) (Munita y Arias 2016). Se han encontrado los genes *tet*(H), *tet*(B), *tet*(G), *tet*(L) y *tet*(K) en patógenos de la familia Pasteurellaceae.

- ii) *Inactivación enzimática o modificación del antibiótico.*

Una de las estrategias más exitosas en la resistencia a antibióticos es la producción de enzimas que modifican químicamente la molécula antibiótica o directamente la destruyen (Munita y Arias 2016, Schwarz, Loeffler *et al.* 2016).

- ii.a) *Acetilación, adenilación y fosforilación.*

Se producen enzimas que, mediante la unión de grupos acetilos, adenilos o fosfatos en puntos críticos del antibiótico impiden que el antibiótico se pueda unir a su diana de manera que no pueden ejercer su función (Schwarz, Loeffler *et al.* 2016). Los antibióticos afectados por estos procesos son aquellos que inhiben la síntesis proteica a nivel de ribosoma (Wilson 2014): aminoglucósidos, cloranfenicol y estreptomicinas –mediante acetilación-; aminoglucósidos y cloranfenicol –mediante fosforilación- y aminoglucósidos y lincosamidas –mediante adenilación- (Munita y Arias 2016). Los ejemplos más típicos son las enzimas modificadoras de aminoglucósidos, que habitualmente están codificadas en elementos genéticos móviles (Munita y Arias 2016).

En este apartado nos centraremos en el gen *strA*, que confiere fenotipo de alta resistencia a estreptomicinas, ya que aparece codificado en el plásmido pB1005 (San Millan, Escudero *et al.* 2009), plásmido importante en el capítulo 3 de esta tesis. Este gen fue descrito por primera vez en *Erwinia amylovora* (Chiou y Jones 1995) y codifica una aminoglucósido-3''fosfotransferasa de 269 aminoácidos que suele encontrarse asociada al gen *strB*, que codifica una aminoglucósido-3''-fosfotransferasa de 278 aminoácidos. *strA* ha sido encontrado tanto en plásmidos como en el cromosoma de numerosas bacterias patógenas o comensales de animales, plantas y humanos (Sundin 2002). En la familia Pasteurellaceae solamente ha sido encontrado en elementos genéticos

móviles en las siguientes especies: *Pasteurella multocida* (San Millan, Escudero *et al.* 2009), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Kang, Zhou *et al.* 2009), *Pasteurella trehalosi* (Kehrenberg, Meunier *et al.* 2006), *Manheimia haemolitica* (Kehrenberg y Schwarz 2002, Eidam, Poehlein *et al.* 2015) y *Haemophilus ducreyi* (Dixon, Albritton *et al.* 1994).

- ii.b) *Inactivación enzimática.*

En el caso de la inactivación enzimática del antibiótico, la bacteria produce enzimas capaces de unirse directamente a la molécula antibiótica y de desintegrarla. El principal mecanismo de inactivación enzimática está constituido por las β -lactamasas, que pueden generar fenotipo de resistencia contra penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenemas (Ozturk, Ozkirimli *et al.* 2015). Estas enzimas degradan el anillo β -lactámico inactivando el antibiótico.

Aunque se han descrito más de 1000 tipos de β -lactamasas (www.lahey.org/studies), centraremos nuestra atención en la β -lactamasa ROB-1 (producida por el gen *bla*_{ROB-1}) ya que es producida por pB1000, plásmido sobre el que trata esta tesis. ROB-1 es una β -lactamasa de espectro reducido, perteneciente a la clase A de Amber y a la clase 2b de Bush por su estructura y su perfil de resistencia respectivamente (Bush y Jacoby 2010). *bla*_{ROB-1} no se ha encontrado en ninguna familia diferente a Pasteurellaceae. En esta familia se ha encontrado en las siguientes especies: *H. influenzae* (Medeiros, Levesque *et al.* 1986, Tristram, Jacobs *et al.* 2007, Tristram, Littlejohn *et al.* 2010, San Millan, Giufre *et al.* 2011, Sondergaard y Norskov-Lauritsen 2016), *Pasteurella multocida* (San Millan, Escudero *et al.* 2009), *Haemophilus parasuis* (San Millan, Escudero *et al.* 2007, Liu, He *et al.* 2011, Moleres, Santos-López *et al.* 2015), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Lalonde, Miller *et al.* 1989, Juteau, Sirois *et al.* 1991, Matter, Rossano *et al.* 2007), *Actinobacillus porcinosillarum* (Matter, Rossano *et al.* 2007), *Haemophilus parainfluenzae* (Sondergaard y Norskov-Lauritsen 2016) y *Pasteurella aerogenes* (Livrelli, Darfeuille-Richaud *et al.* 1988). *bla*_{ROB-1} solamente ha sido descrito una vez codificado en un cromosoma (Livrelli, Darfeuille-Richaud *et al.* 1988), mientras que en el resto de descripciones aparece codificada en elementos genéticos móviles (ya sea en

plásmidos pequeños o en elementos integrativos conjugativos), habitualmente asociada a la secuencia de inserción IS*Apl1* (Liu, Tan *et al.* 2008, Tegetmeyer, Jones *et al.* 2008) cuya implicación en el movimiento de la secuencia de *bla*_{ROB-1} se especula (San Millan, Escudero *et al.* 2009, Moleres, Santos-López *et al.* 2015). ROB-1 es una proteína de 305 aminoácidos que confiere resistencia a penicilinas, cefalosporinas de 1º generación y cefaclor. *In vitro* se ha detectado que es capaz de ampliar su espectro de acción a cefalosporinas de tercera generación e inhibidores de β-lactamasas (Galan, Morosini *et al.* 2003).

- iii) *Modificación, reducción de la expresión o protección de la diana de acción del antibiótico.*

Este grupo es el más variable. Existen diferentes mecanismos de alteración de la diana implicados en resistencia a fluoroquinolonas, macrólidos, estreptomicinas, tetraciclinas y penicilinas, entre otros (Schwarz, Loeffler *et al.* 2016). Aunque algunos de los determinantes que codifican proteínas que confieren resistencia mediante la protección de la diana han sido encontrados en cromosomas, la mayor parte de los genes clínicamente relevantes involucrados en este mecanismo de resistencia están codificados en elementos genéticos móviles. Ejemplos de genes de resistencia a antibióticos clínicamente relevantes son *tet*(M), *tet*(O) –que confieren resistencia a tetraciclinas-, *qnr* –que confiere resistencia a fluoroquinolonas- y *fusB* y *fusC* –que confieren resistencias al ácido fusídico (Munita y Arias 2016). En esta sección nos centraremos en el gen *tet*(O), ya que aparece codificado en el plásmido pB1006, que será objeto de estudio en el tercer capítulo de esta tesis (San Millan, Escudero *et al.* 2009). *tet*(O) fue descrito inicialmente en *Campylobacter jejuni*, pero actualmente se encuentra distribuido en diferentes especies bacterianas diseminado en plásmidos y en transposones conjugativos (Connell, Tracz *et al.* 2003). *tet*(O) codifica una GTPasa que actúa como homólogo de los factores de elongación EF-G y EFtu, que participan en la síntesis de proteínas. *tet*(O) interactúa con el ribosoma, desalojando a la tetraciclina de una manera GTP-dependiente. Además impide la re-unión de la tetraciclina al ribosoma (Munita y Arias 2016). En la familia Pasteurellaceae *tet*(O) se ha encontrado codificado en plásmidos en

varias cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Blanco, Gutiérrez-Martin *et al.* 2006) y de *Pasteurella multocida* (San Millan, Escudero *et al.* 2009).

1.1.6. Éxito y persistencia de las resistencias

Que la resistencia a los antibióticos persista en un patógeno después de emerger dependerá en general de la presión de selección a la que se vea expuesta. La fuerza selectiva más obvia que genera una ventaja directa a la bacteria resistente es la causada por una exposición a concentraciones de antibiótico letales o inhibitorias para la bacteria sensible (Andersson 2016). Sin embargo, existe una fuerza contraria, el coste biológico de la resistencia. El coste biológico es un efecto subyacente del mecanismo de resistencia que reduce la habilidad del patógeno para crecer, persistir o diseminarse en el nicho (Andersson y Hughes 2010). Tanto modelos experimentales como modelos empíricos afirman que el coste biológico de las resistencias disminuirá la presencia de las mismas en los diferentes ambientes, de tal modo que, cuanto mayor coste biológico, menor frecuencia de bacterias resistentes habrá (Bottger, Springer *et al.* 1998, Sander, Springer *et al.* 2002, Cohen, Sommers *et al.* 2003).

Existen varias fuerzas que pueden estabilizar la resistencia en las poblaciones bacterianas incluso cuando no hay antibiótico o está presente en concentraciones muy bajas. A continuación introduciremos los mecanismos por los que los genes de resistencia pueden ser seleccionados en las poblaciones ilustrando con algún ejemplo representativo.

- i) Selección directa mediante presencia de antibióticos por encima de la CMI

Cuando una población sensible esté expuesta a concentraciones letales de antibiótico (por encima de la CMI) solamente sobrevivirán los mutantes pre-existentes que muestren un alto nivel de resistencia (Andersson y Hughes 2014) (Figura 3). Como hemos visto, la aparición de resistencias dependerá del ratio de transferencia y/o de aparición mutaciones. Tradicionalmente se ha propuesto que la selección de bacterias resistentes solamente ocurre entre la concentración que inhibe a la bacteria sensible y la concentración que es letal para la bacteria resistente (este rango de concentraciones se conoce como la “ventana de selección de mutantes”) (Drlica 2003) (Figura 4). Concentraciones de antibiótico

comprendidas en la ventana de selección eliminarán a las bacterias sensibles, mientras que concentraciones de antibiótico por encima de la ventana de selección impedirán la aparición de bacterias resistentes.

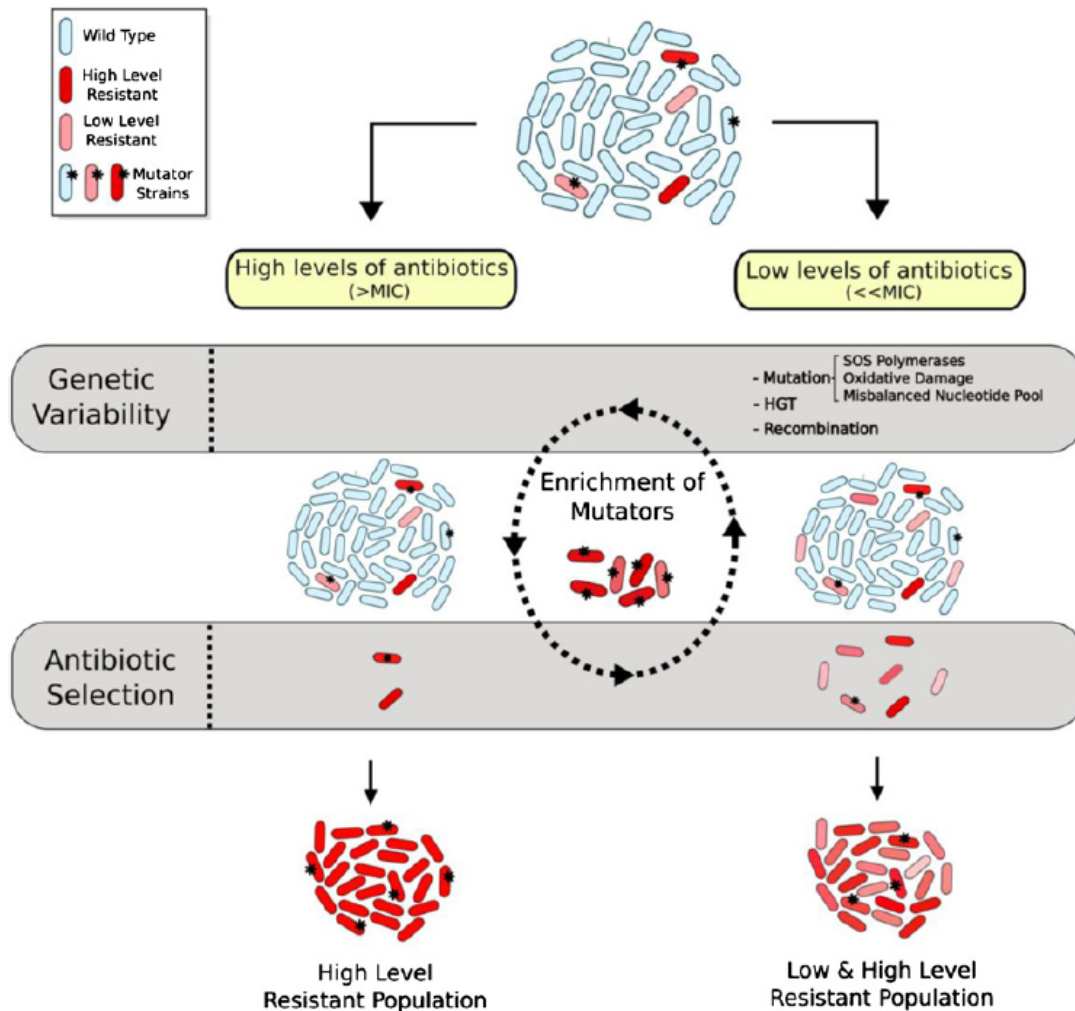


Figura 3. Comparación de selección por encima y por debajo de la CMI.

Si una población se enfrenta a una concentración antibiótica por encima de la CMI, las bacterias resistentes serán seleccionadas, estableciendo una población de bacterias altamente resistentes. Alternativamente, si una población se enfrenta a una población Sub-CMI, se producirán los mecanismos discutidos en el texto, aumentando las probabilidades de que se generen resistencias en la población. Figura obtenida de Rodríguez-Rojas, Rodríguez-Beltrán *et al* 2013.

Otro factor importante es el aumento en la prevalencia de las resistencias como resultado de la exposición de la población a los antibióticos, que se traduce en una ausencia de competidores en el ambiente (Andersson y Hughes 2010, Rodríguez-Rojas, Rodríguez-Beltrán *et al.* 2013). El aumento de población resistente debido a procesos de selección por concentraciones antibióticas letales, también aumentará la probabilidad de que aparezcan

mutaciones compensatorias que disminuyan el coste biológico de los replicones (San Millan, Peña-Miller *et al.* 2014). De tal modo, aunque la presencia de antibióticos no aumente directamente la THG (Lopatkin, Huang *et al.* 2016) – puede afectarla por mecanismos dependientes del sistema SOS (Beaber, Hochhut *et al.* 2004, Ubeda, Maiques *et al.* 2005) o aumentando la tasa de captación de ADN del medio (Charpentier, Kay *et al.* 2011)- sí facilitará la estabilidad del mecanismo de resistencia y su posterior selección en el ambiente. El éxito de las resistencias mediante THG será determinante en bacterias patógenas, dada la cantidad de genes de resistencia a antibióticos vista en la microbiota humana (Sommer, Dantas *et al.* 2009, van Schaik 2015).

- ii) *Selección mediante concentraciones Sub-CMI.*

En gran cantidad de ambientes, e incluso en órganos humanos, las mediciones de los niveles de antibióticos indican que las bacterias –patógenas o no- están frecuentemente expuestas a niveles sub-CMI de antibiótico (Davies, Spiegelman *et al.* 2006, Baquero, Martinez *et al.* 2008, Martinez, Fajardo *et al.* 2009, Fram y Belitz 2011, Davies 2013, Jiang, Hu *et al.* 2013, Khan, Berglund *et al.* 2013). Recordemos que las concentraciones Sub-CMI son aquellas en las que las bacterias sensibles pueden crecer, comprometiendo ligeramente su ratio de crecimiento (Andersson y Hughes 2014).

Se ha demostrado que las concentraciones Sub-CMI de antibiótico pueden influir en la aparición de resistencias incrementando la mutagénesis, pueden afectar a la virulencia de los patógenos y promueven la THG y la recombinación (para más información ver revisiones (Rodriguez-Rojas, Rodriguez-Beltran *et al.* 2013, Andersson y Hughes 2014) (Figura 3). Estudios recientes *in vitro* e *in vivo* han demostrado que concentraciones antibióticas Sub-CMI también pueden ser importantes para el enriquecimiento de bacterias resistentes pre-existentes (Gullberg, Cao *et al.* 2011, McVicker, Prajsnar *et al.* 2014). En ausencia de presión antibiótica, la competición directa entre las cepas sensibles mostró una ventaja para la cepa sensible debido al coste biológico asociado a los determinantes de resistencia. Sin embargo, en competiciones directas en presencia de diferentes concentraciones de antibióticos –todas por debajo de la CMI de la bacteria sensible-, se observó una selección positiva para

las bacterias portadoras de las resistencias a partir de cierta concentración de antibiótico en el medio. En otras palabras, a partir de cierta concentración antibiótica (concentración mínima selectiva, CMS), que es diferente para cada tipo de antibiótico, las bacterias portando determinantes de resistencia eran capaces de dominar las competiciones (Figura 4). La CMS depende tanto del antibiótico como del entorno genético donde se encuentre codificado el determinante de resistencia y también de su coste biológico. Se ha descrito que concentraciones Sub-CMI son capaces de estabilizar plásmidos multirresistentes en un ensayo *in vitro* (Gullberg, Albrecht *et al.* 2014, Bottery, Wood *et al.* 2016) y cuando las resistencias son transferidas al cromosoma, la CMS es menor que cuando están codificadas en el replicón, debido al coste intrínseco del plásmido.

Por tanto, la selección de mutantes resistentes no solamente ocurre en la ventana de selección tradicional, sino que también aparece en concentraciones

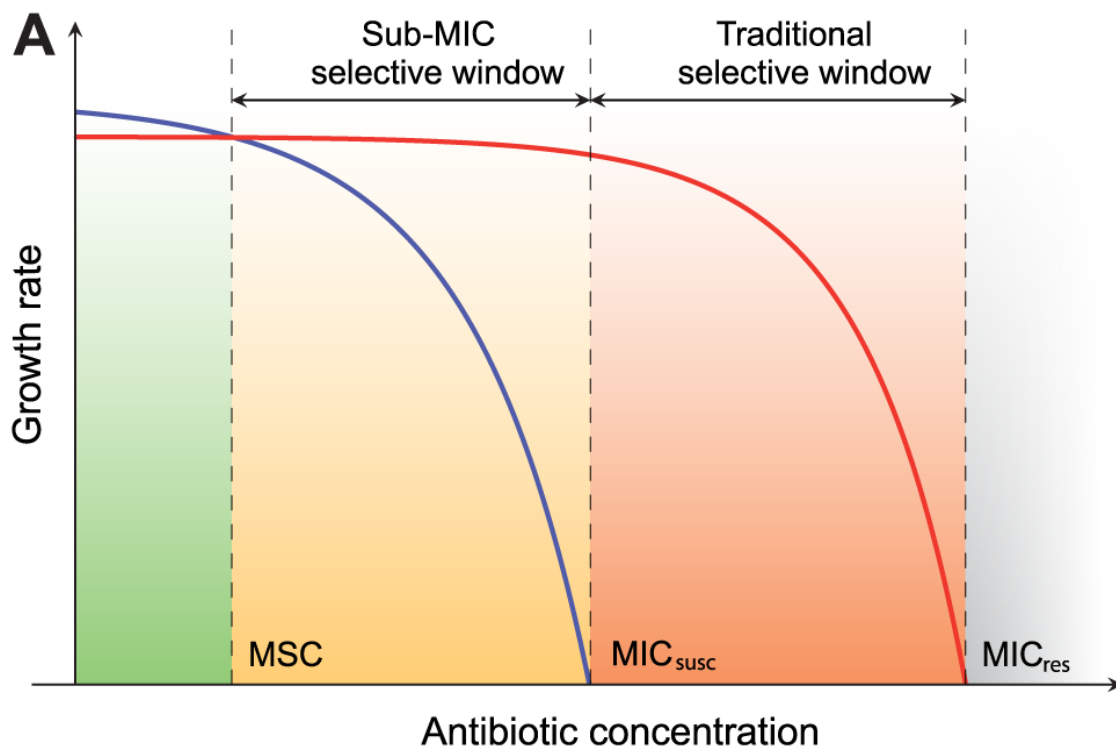


Figura 4. Ratios de crecimiento como función de la concentración de antibiótico.

Representación esquemática de los ratios de crecimiento en función del antibiótico. La zona verde indica el intervalo de concentración donde la bacteria susceptible (línea azul) crece mejor que la bacteria resistente (línea roja). Los rectángulos naranja (ventana de selección Sub-CMI) y rojo (ventana de selección de mutantes tradicional) indican los intervalos de concentración donde las bacterias resistentes tienen mejor *fitness* que las bacterias sensibles. MIC_{susc} es la CMI de la bacteria sensible, MIC_{res} es la CMI de la bacteria resistente y MSC (o CMS) es la concentración mínima selectiva

de antibiótico entre la CMS y la CMI de la cepa sensible –rango conocido como ventana de selección Sub-CMI- (Gullberg, Cao *et al.* 2011).

- iii) *Variabilidad del coste biológico.*

En principio, un coste biológico de un 0,001% por generación –disminución de un 0,001% del crecimiento bacteriano- provocará que el gen de resistencia desaparezca en la población por selección natural si no existe presión antibiótica en el ambiente (Andersson 2016). El coste biológico asociado a los determinantes genéticos es altamente variable. Depende de una gran variedad de factores, como pueden ser los efectos bioquímicos específicos de la mutación que genera la resistencia o el ambiente genético –plásmido/cromosoma- y ecológico en el que se codifica dicha resistencia (ver revisiones (Lenski 1997, Andersson y Hughes 2010, Vogwill y MacLean 2015) y se puede estimar de las maneras resumidas en la figura 5. Algunas resistencias mediadas por mutaciones o codificadas en plásmidos varían su coste biológico en función de la cepa bacteriana y/o del plásmido en el que esté codificada la resistencia como causa de interacciones epistáticas entre el gen de resistencia y otros genes presentes en la bacteria (Andersson 2016). En general, a pesar de que puede ser contraintuitivo, el coste biológico de las resistencias codificadas en plásmidos es menor que el coste biológico de las resistencias generadas por eventos mutacionales en el cromosoma (Vogwill y MacLean 2015). Sin embargo, cuando la misma resistencia está codificada en un plásmido y en el cromosoma, existe un mayor coste biológico asociado a la resistencia codificada en el plásmido (Gullberg, Albrecht *et al.* 2014) debido al coste biológico impuesto por los replicones (Baltrus 2013).

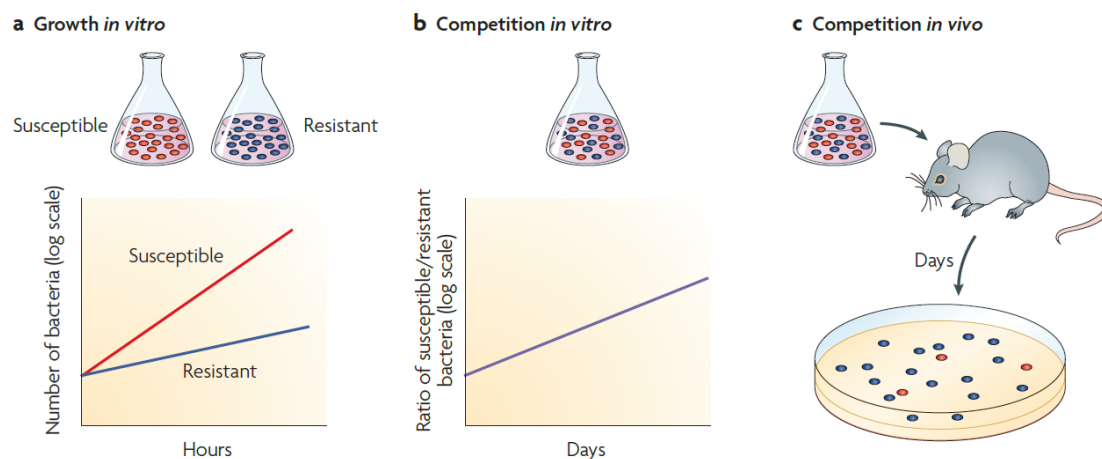


Figura 5. Modos de estimación del coste biológico.

Para estimar el coste biológico de un determinante de resistencia, (o de elemento genético móvil), se necesitan dos poblaciones isogénicas diferenciadas solamente en dicho determinante. a) Mediciones del ratio de crecimiento bacteriano de bacterias resistentes y sensibles *in vitro*. Las mediciones *in vitro* pueden revelar grandes variaciones en el *fitness* bacteriano debido al coste biológico. b) Competiciones *in vitro* en los que los cultivos resistentes y sensibles son mezclados en el mismo medio. Las diferencias en el *fitness* causadas por el coste biológico entre la cepa sensible y la resistente, será revelado como el cambio en el ratio de las dos bacterias competidoras. c) Un modelo animal puede ser infectado con una mezcla de bacterias resistentes y sensibles y cada día durante varios días, se medirá el ratio de cada de las poblaciones. Figura obtenida de Andersson y Hughes 2014.

El menor coste de las resistencias mediadas por los plásmidos, así como la posible presencia de varios determinantes de resistencia en los mismos, que les permite generar multirresistencia en un solo evento de transferencia, y la capacidad de transmisión de los replicones, podrían ser las claves de que la resistencia mediada por los plásmidos sea más relevante en la naturaleza que las mutaciones que generan resistencias aparecidas *de novo* (Vogwill y MacLean 2015).

- iii.a) Resistencias sin coste biológico.

Existen numerosos ejemplos en los que las resistencias no tienen un coste biológico asociado y por tanto, en ambientes sin presión antibiótica, las bacterias resistentes no serían contra-seleccionadas (Figura 6).

Por ejemplo, la resistencia a colistina mediada por la interrupción del *mgrB* en *Klebsiella pneumoniae* no está asociada a ningún coste biológico significativo (Cannatelli, Santos-Lopez *et al.* 2015). Del mismo modo, la resistencia a estreptomicina causada por la substitución K42R en *rpsL*, que codifica la proteína S12 de la subunidad 30S del ribosoma, parece que no tiene

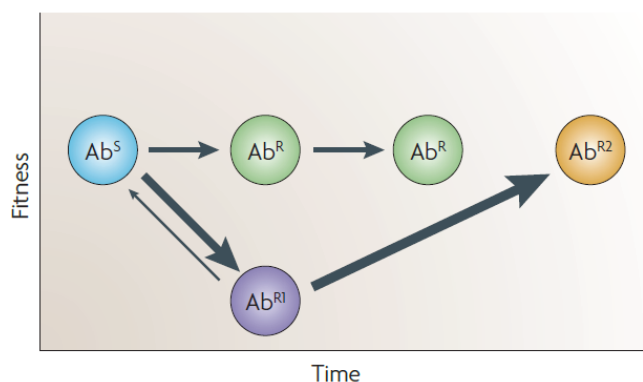


Figura 6. Desarrollo de resistencias a antibióticos y su efecto en el *fitness* bacteriano.

La adaptación a los antibióticos de una bacteria sensible (Ab^S), normalmente necesita dos pasos: Primero un mecanismo de resistencia es seleccionado (Ab^R y Ab^{R1}). Ab^R designa los casos en los que el desarrollo de la resistencia no está asociada a un coste biológico y Ab^{R1} designa el mecanismo más común, en el que la resistencia sí lleva asociado un coste biológico. Por tanto, Ab^{R1} se adaptará para reducir el coste biológico mediante, por ejemplo, mutaciones compensatorias (Ab^{R2}). El grosor de las flechas determina los ratios relativos de conversión. Figura obtenida de Sandegren y Andersson 2009

coste biológico en *E. coli* y en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, e incluso mejora el crecimiento bacteriano en modelos murinos y porcinos (Bjorkman, Hughes *et al.* 1998, Enne, Delsol *et al.* 2005). Finalmente, la resistencia a aminoglucósidos en *E.coli* mediada por la metiltransferasa *rmtC*, que metila el residuo G1405 del ARN 16S, no tiene un coste biológico significativo (Gutierrez, Escudero *et al.* 2012).

- iii.b) Mejoras del *fitness* debidas a la presencia de genes de resistencia.

Existen casos en los que la presencia de un determinante de resistencia a antibióticos mejora el crecimiento bacteriano. Como hemos citado, la resistencia a fluoroquinolonas en *E. coli* mediada por la substitución K42R en *rpsL* mejora el crecimiento bacteriano en infecciones en cerdos (Enne, Delsol *et al.* 2005). Aparece otro ejemplo en la bibliografía en el que el cambio de ambiente genético tiene implicaciones positivas en el crecimiento bacteriano: mutaciones en *gyrA* confieren resistencia a la quinolona ciprofloxacina en *Campylobacter jejuni*. Cuando se inoculan en un modelo de infección de gallinas bacterias resistentes y bacterias sensibles isogénicas a las cepas resistentes excepto por la substitución C257T en *gyrA*, las bacterias resistentes son capaces de dominar la competición debido a las mejoras en el crecimiento causadas por la presencia de la mutación. Sin embargo, cuando esta mutación es transferida a diferentes variantes de *C. jejuni* sí tiene un coste biológico significativo (Luo, Pereira *et al.* 2005). Se ha descrito también cómo plásmidos que codifican determinantes de resistencia mejoran el *fitness* bacteriano (Enne, Bennett *et al.* 2004, San Millan, Heilbron *et al.* 2014). El plásmido tipo ColE1 p9123, que codifica los genes de resistencia *sul2*, *strA* y *strB*, cuando está presente en *E. coli* confiere una ventaja

de un 4% en crecimiento a la cepa resistente en competición directa contra la cepa sensible (Enne, Delsol *et al.* 2005). Los plásmidos pN105 y pAKD1, que confieren resistencia a aminoglucósidos y estreptomicina respectivamente, cuando cohabitan en *Pseudomonas aeruginosa* mejoran el crecimiento de la célula resistente (San Millan, Heilbron *et al.* 2014). En ninguno de los ejemplos se conoce cómo las resistencias codificadas en plásmidos (o los propios plásmidos) pueden mejorar el crecimiento bacteriano.

- iii.c) Fenómenos epistáticos y compensación del coste biológico.

Los genes de resistencia a antibióticos desequilibran la expresión genética y las funciones celulares, que previamente estaban optimizadas para maximizar el *fitness* bacteriano (Andersson 2016). Dentro de las resistencias, las mutaciones que alteran la topología del ADN tienen menos impacto en el coste biológico que las mutaciones que afectan a la transcripción o la traducción (Vogwill y MacLean 2015).

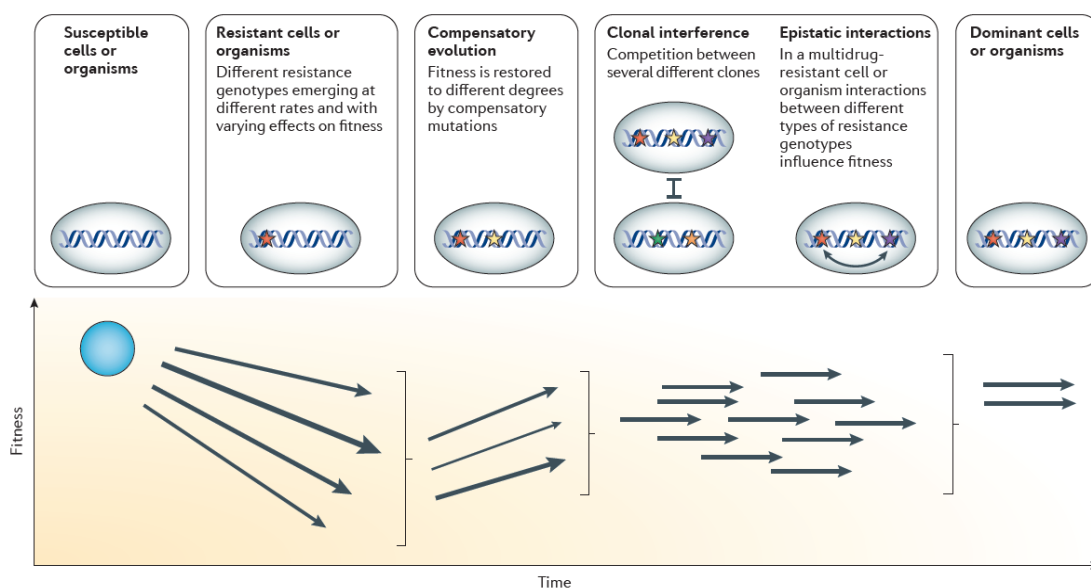


Figura 7. Trayectorias evolutivas de la aparición de bacterias resistentes a antibióticos.

Progresión evolutiva de una cepa sensible hasta convertirse en una bacteria resistente y sus efectos en el coste biológico de la resistencia. En la parte de arriba de la figura aparecen los ejemplos discutidos en la sección 1.6.iii.c de esta tesis doctoral, dónde las mutaciones de resistencia están marcadas con diferentes estrellas. De izquierda a derecha: variaciones resistentes de la cepa sensible aparecen y acarrear una disminución del *fitness* bacteriano debido al coste biológico. La evolución compensatoria restaurará el crecimiento de las cepas mutadas. Múltiples mutantes aparecen frecuentemente en la población, y la selección de estos mutantes dependerá de los efectos relativos en el *fitness* que tengan mediante competiciones entre los clones e interacciones epistáticas entre las mutaciones. Finalmente sobrevivirán aquellos clones que produzcan suficiente resistencia sin un coste biológico elevado. Figura obtenida de Hughes y Andersson 2015.

Un proceso común que estabiliza las resistencias es la evolución compensatoria, mediante la cual se favorece la selección de mutantes en la célula que restauran el equilibrio de los procesos celulares, de tal modo que se reduce o elimina el coste de la resistencia (Figuras 6 y 7). Estas mutaciones compensatorias a menudo aparecen *in vivo* e *in vitro* –mediante pases seriados– habitualmente sin afectar al nivel de resistencia y seleccionarán a las bacterias resistentes en ambientes sin presión antibiótica (Hughes y Andersson 2015). Los mecanismos genéticos de la compensación varían dependiendo del antibiótico, del ratio de aparición de mutaciones, del coste de los diferentes mutantes y del lugar donde esté codificada la resistencia (plásmido/cromosoma) y del microorganismo en sí (Bjorkman, Nagaev *et al.* 2000, Levin, Perrot *et al.* 2000). Estos mecanismos pueden incluir mutaciones en el gen de resistencia, en genes que alteren su expresión o disminuyan su carga genética, o en otros genes que puedan de algún modo balancear de nuevo todos los procesos celulares (Andersson 2016). Un buen ejemplo sobre cómo actúa la compensación en la reducción del coste biológico de la resistencia es el descrito por Knopp *et al.* en 2015 (Knopp y Andersson 2015). Mutaciones en las porinas *ompCF*, implicadas en la adquisición de nutrientes y en la expulsión de elementos tóxicos para la célula (Gehring y Nikaido 1989), reducen el *fitness* bacteriano (alrededor de un 15% en ausencia de antibióticos) e incrementan la resistencia a diferentes carbapenemas entre 4 y 60 diluciones. Tras propagar diferentes líneas de bacterias con las porinas mutadas, las bacterias resistentes consiguen compensar el coste biológico de la resistencia mediante dos mecanismos diferentes: i) aumento de la expresión de otra porina (PhoE) mediante mutaciones en *phoR* y *pstS* que pueden substituir el papel inicial de las proteínas OmpCF (este primer mecanismo produce una pérdida de la resistencia a antibióticos) y ii) mutaciones en *hfq* y *chiX*, que causan la sobreexpresión de la porina PhoE, manteniendo el nivel de resistencia a antibióticos.

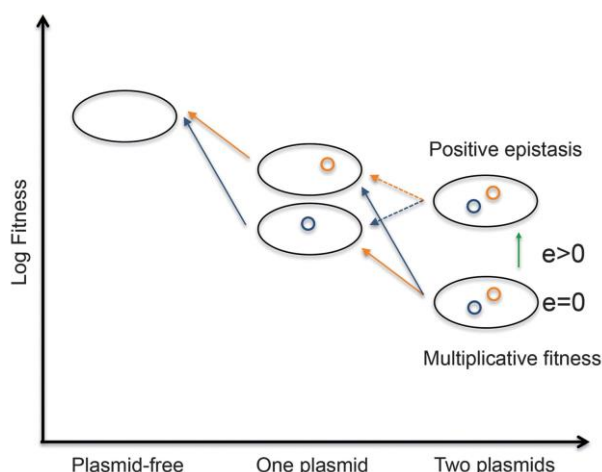


Figura 8. Efecto de la epistasis en bacterias multirresistentes.

Representación esquemática del *fitness* de una bacteria portando cero determinantes de resistencia (o plásmidos), portando uno o dos. En el ejemplo la bacteria portando dos determinantes, puede presentar tanto *fitness* multiplicativo (no existen interacciones epistáticas, $e = 0$) o epistasis positiva ($e > 0$). En el caso de la epistasis positiva, la ventaja asociada a la pérdida de un plásmido será menor que en el caso del *fitness* multiplicativo ($e = 0$). La pérdida del determinante puede incluso provocar una disminución en el coste *fitness* bacteriano. Figura obtenida de San Millan *et al.* 2014

Además de la evolución compensatoria, el coste biológico de los determinantes de resistencia puede ser reducido por efectos epistáticos entre diferentes mutaciones que generan resistencia (Figuras 7 y 8). Si las interacciones epistáticas entre los diferentes determinantes son positivas, el coste biológico de cada determinante de resistencia por separado será mayor que cuando ambos determinantes se encuentren en la misma célula (Vogwill y MacLean 2015) (Figura 8). La epistasis (e) se calcula con la siguiente fórmula (Silva, Mendonça *et al.* 2011): $e = w_{a,b} - w_a \times w_b$ dónde

$w_{a,b}$, w_a , y w_b son el *fitness* (relativo a

la bacteria sensible) de las cepas portando la resistencia a, b o ambas. Cuando el valor de e es mayor que cero, se considera que existe una epistasis positiva, es decir los costes biológicos de los determinantes de resistencia son menores cuando están presentes en la misma bacteria.

Cuando la resistencia evoluciona mediante mutaciones en múltiples genes, las interacciones epistáticas entre las mutaciones de resistencia tienen el potencial para influir en el coste biológico total asociado con el conjunto de las resistencias (Vogwill y MacLean 2015). Las mutaciones epistáticas que confieren resistencia a varios antibióticos están distribuidas globalmente y se pueden encontrar en: i) diferentes genes que confieren resistencia para un mismo antibiótico (Bjorkman, Hughes *et al.* 1998, Bjorkman, Samuelsson *et al.* 1999), ii) entre diferentes genes cromosómicos (Trindade, Sousa *et al.* 2009, Albarracin Orio, Pinas *et al.* 2011, Durao, Trindade *et al.* 2015), iii) entre mutaciones cromosómicas y plásmidos (Silva, Mendonça *et al.* 2011) y iv) entre plásmidos (San Millan, Heilbron *et al.* 2014). En los casos en los que se

producen interacciones epistáticas entre diferentes genes que confieren resistencia a diferentes antibióticos, las bacterias portando ambos determinantes pueden tener mejor *fitness* que las bacterias portando solamente uno de los determinantes de resistencia, de tal modo que la multirresistencia será seleccionada en ambientes sin presión a antibióticos.

Cómo actúan la epistasis y las mutaciones compensatorias para mantener mecanismos de resistencia codificados en elementos genéticos móviles será introducido en el apartado v) de esta sección: *Persistencia de los plásmidos*.

- iv) *Coselección de resistencias*.

Un determinante de resistencia puede incrementar su frecuencia en virtud de su unión genética a otro determinante de resistencia. Este hecho es muy evidente en la resistencia mediada por THG en los que un solo plásmido puede codificar varios genes de resistencia, pero la coselección también puede tener lugar a nivel clonal, de tal manera que un clon porte diferentes determinantes de resistencia (Andersson 2016). Esto supone que la selección para un determinante de resistencia puede coseleccionar otros genes de resistencia presentes en la bacteria, favoreciéndose así la multirresistencia. La coselección ha provocado que la reducción del uso de determinados antibióticos en diferentes países no haya tenido una repercusión en la reducción de las resistencias a dichos antibióticos. En Suecia, intentaron reducir las resistencias a trimetoprim en *E. coli* reduciendo su uso durante 24 meses. Sin embargo, la coselección por el uso de otros antibióticos (fluoroquinolonas, cefalosporinas, etc.) impidió la reducción de la resistencia a trimetoprim en *E. coli* (Sundqvist, Geli *et al.* 2010). En Gran Bretaña, redujeron el uso de sulfonamidas un 97% entre 1991 y 1999. Sin embargo, no encontraron una disminución de las resistencias a este antibiótico. Los genes de resistencia a sulfonamidas suelen aparecer en *clusters* con otros genes de resistencia –por ejemplo *sul2* suele aparecer en un casete junto con *strA* y *strB*, implicados en la resistencia a estreptomicinas- que permitieron la coselección de las resistencias a sulfonamidas durante ese periodo (Enne, Livermore *et al.* 2001).

- v) *Persistencia de los plásmidos*

Explicar la existencia y persistencia de plásmidos en las poblaciones bacterianas supone un reto conocido como la paradoja de los plásmidos (Harrison y Brockhurst 2012): en ausencia de presión antibiótica se prevé que los plásmidos –conjugativos y no conjugativos– se perderán en la población debido al coste biológico generado por los replicones a no ser que los plásmidos sean capaces de incrementar drásticamente su capacidad de movilización. La pérdida de plásmidos se produce en dos niveles: primero, por estocasticidad, aparecerán bacterias libres de plásmido tras la duplicación celular; después, la competición directa entre las bacterias portando plásmidos y las nuevas segregantes sin plásmidos, generará la desaparición en la población de las bacterias portadoras de replicones debido al coste de los mismos. Por otro lado, cuando hay presión antibiótica, los genes beneficiosos (como pueden ser los determinantes de resistencia) podrían ser integrados en los cromosomas evitando así el coste biológico asociado a los replicones.

Existen mecanismos que ayudan a la estabilidad de los replicones aun sin presión antibiótica (Ayala-Sanmartín y Gómez-Eichelmann 1989) como son los sistemas de muerte post-segregación mediante mecanismos toxina/antitoxina o mecanismos de partición activa de los replicones que asegura la presencia de al menos una copia del plásmido en cada célula hija (ver sección 2.4 de la introducción “Estabilidad de los plásmidos tipo ColE1”).

Tres de los cuatro apartados anteriores (selección por encima y por debajo de la CMI, y coselección) contribuyen a la persistencia de los replicones en las poblaciones. Resulta evidente cómo concentraciones letales de antibiótico seleccionarán a las bacterias portando a los replicones y coseleccionando otros genes accesorios portados por los plásmidos. También se ha demostrado cómo concentraciones Sub-CMI de antibióticos y de metales pesados son capaces de estabilizar replicones mejorando el *fitness* de las bacterias portadoras frente a las bacterias libres de plásmidos (Gullberg, Albrecht *et al.* 2014, Bottery, Wood *et al.* 2016). Otro factor que ayuda a la estabilidad de los plásmidos resistentes en las poblaciones es su capacidad conjugativa, que puede compensar la pérdida asociada al coste biológico determinado por los replicones (Bergström, Lipsitch

et al. 2000), aunque se especula que los ratios necesarios para que la conjugación compense la pérdida causada por el coste biológico no pueden encontrarse en la naturaleza (Sorensen, Bailey *et al.* 2005).

Los determinantes de resistencia codificados en elementos genéticos móviles conllevan tanto el coste biológico del replicón como el asociado a los determinantes no esenciales codificados en el mismo. Existen cinco motivos por los que los plásmidos pueden disminuir el *fitness* bacteriano (Baltrus 2013): (i) disrupción de determinantes genéticos que se pueden producir como consecuencia de la inserción del elemento genético móvil tras la THG, que pueden afectar a desregulación de proteínas cromosómicas; (ii) efectos citotóxicos causados por mala expresión de los genes codificados en los replicones; (iii) secuestro de recursos limitados para la célula, como son las fuentes de carbono, nitrógeno o fósforo implicados en el metabolismo o de fuentes de energía como ATP, así como secuestro de la maquinaria implicada en la replicación y la traducción; (iv) interacciones disruptivas con redes celulares, que pueden estar relacionadas con la inducción del sistema SOS; y (v) efectos sobre la célula a nivel global alterando señalizadores celulares como por ejemplo AMPc. Además se ha visto que, tras la conjugación, la incapacidad del plásmido de regular negativamente su transcripción (como lo hacía en la célula donadora) genera un coste biológico transitorio en la célula receptora (Fernandez-Lopez, Del Campo *et al.* 2014). El coste biológico de los plásmidos que codifican determinantes de resistencia también puede ser disminuido por evolución compensatoria o por fenómenos epistáticos (Figura 8).

v.a) La evolución compensatoria en asociaciones plásmido/hospedador

La estabilidad de los replicones puede ser atribuida a adaptación evolutiva entre el cromosoma y los plásmidos. Los plásmidos tienen un coste cuando son adquiridos *de novo* por una bacteria. Esta carga metabólica se pierde tras la evolución plásmido/bacteria en presencia o ausencia de antibióticos (ver revisión (Harrison y Brockhurst 2012) y los artículos [(Bouma y Lenski 1988, Dahlberg y Chao 2003, San Millan, Peña-Miller *et al.* 2014, Harrison, Guymer *et al.* 2015, Pena-Miller, Rodriguez-Gonzalez *et al.* 2015, San Millan, Toll-Riera *et al.* 2015, Hall, Wood *et al.* 2016, Loftie-Eaton, Yano *et al.* 2016,

Porse, Schonning *et al.* 2016, Yano, Wegrzyn *et al.* 2016)]. Si el coste metabólico de los replicones no se compensa durante la coevolución bacteria/plásmido, aquellas bacterias que porten los plásmidos se perderán en ausencia de antibióticos por competición directa frente a las bacterias no portadoras de replicones.

La aparición de mutaciones compensatorias que disminuyan el coste biológico asociado a los replicones dependerá del ratio de pérdida de los plásmidos, del ratio de conjugación, de los sistemas conjugativos y del coste inicial de los replicones (Harrison, Dytham *et al.* 2016). El coste biológico de los plásmidos puede ser compensado de tres maneras (Harrison y Brockhurst 2012): disminución del ratio de conjugación de los replicones, pérdida de genes, reduciendo así los costes asociados a su expresión, y reducción de la expresión genética, ya sea mediante regulación de la expresión de genes o disminución del número de copias de los replicones. Estos tres mecanismos pueden aparecer mediante alteraciones en el cromosoma, en el plásmido o en ambos y depende de dónde aparezcan (Figura 8):

Existen ejemplos en los que las mutaciones compensatorias se producen solamente en el plásmido. El plásmido pKP33, un plásmido conjugativo multirresistente de 73 kilobases encontrado en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, compensa su alto coste biológico (entre el 6% y el 12,5% dependiendo de la cepa en la que se encuentre) mediante la delección de 25 kilobases mediada por la secuencia de inserción IS26 (Porse, Schonning *et al.* 2016). La eliminación de esta región supone la pérdida del sistema de secreción tipo IV, implicado en la conjugación plasmídica, reduciendo de tal modo los costes biológicos asociados a la conjugación aunque comprometiendo su capacidad conjugativa entre las bacterias (Porse, Schonning *et al.* 2016). La evolución compensatoria mediante la delección del sistema conjugativo, también vista por Dahlberg *et al.* (Dahlberg y Chao 2003), es un caso de compensación específica entre el plásmido y el hospedador. En este caso el plásmido se mantendrá en la población a pesar reducir su capacidad conjugativa, es decir, se produce un equilibrio entre la transmisión vertical y horizontal del replicón. Los plásmidos que evolucionen disminuyendo su capacidad conjugativa deberán reducir su coste biológico, mientras que los plásmidos que evolucionen

aumentando su ratio de conjugación aumentarán su coste biológico en las bacterias (Harrison y Brockhurst 2012) debido al coste biológico asociado a la expresión del pili conjugativo y al impacto que la conjugación tiene en la bacteria receptora (Fernandez-Lopez, Del Campo *et al.* 2014).

La reducción del coste biológico en el plásmido pequeño pNUK73 se produce como consecuencia de mutaciones en el cromosoma. pNUK73 es un plásmido multicopia portador de una aminoglucósido 3'-fosfotransferasa que confiere resistencia a aminoglucósidos, y que impone un alto coste biológico (aproximadamente de un 25%) en *Pseudomonas aeruginosa* (San Millan, Peña-Miller *et al.* 2014). En ausencia de presión antibiótica el plásmido es altamente inestable y se pierde rápidamente en la población. Cuando este plásmido es introducido en la bacteria, el 13% de los genes de *P. aeruginosa* PAO1 se ve alterado por una sobre-expresión del gen *rep* -implicado en la replicación del plásmido- ya que activa el sistema SOS bacteriano (San Millan, Toll-Riera *et al.* 2015), lo que provoca esa elevada reducción del fitness bacteriano. Mutaciones compensatorias, aparecidas tras evoluciones experimentales, en una helicasa putativa y en dos kinasas, reducen el coste biológico del replicón disminuyendo la expresión de Rep, volviendo la cepa PAO1/pNUK7 a los niveles transcripcionales previos a la adquisición del replicón. Sorprendentemente, la disminución de la expresión de Rep no afectó al número de copias del replicón. La alteración de la transcripción tras la adquisición de un replicón se ha visto en más asociaciones plásmido/bacteria. El plásmido pQBR103, que porta un transposón de resistencia a mercurio, cuando es adquirido por *Pseudomonas fluorescens* SBW25 altera la expresión del 16% de los genes de la bacteria (Harrison, Guymer *et al.* 2015). Al contrario que pNUK7, pQBR103 es estable en *P. fluorescens*. Mutaciones en el sistema *gacA-gacS* eliminan el coste biológico asociado al replicón en ausencia de presión selectiva, mientras que estas mismas mutaciones mejoran el fitness de SBW25/pQBR103 en presencia de mercurio en el medio.

Finalmente también aparecen mutaciones en el cromosoma y en los plásmidos cuya interacción favorece la estabilidad final de los replicones. Mutaciones en la proteína reguladora de la quimiotaxis CheY (homóloga a la proteína GacA), en la proteína 5S de la subunidad 30S ribosomal y en una

helicasa putativa del cromosoma mejoran la estabilidad del replicón pMS0506 en *Pseudomonas morviensis*. La mejora en la estabilidad se debe probablemente a la represión de genes. La adquisición por parte del replicón del elemento transponible Tn6321, que porta un sistema toxina-antitoxina y un mecanismo de resolución de dímeros procedente de otro plásmido presente en la bacteria también mejora ligeramente la estabilidad y la persistencia del replicón. Sin embargo, la combinación de mutaciones en el cromosoma y en el plásmido produce un efecto mayor en la estabilidad del replicón debido a efectos epistáticos entre el transposón y las mutaciones cromosómicas. (Loftie-Eaton, Yano *et al.* 2016). Este plásmido también es capaz de compensar su coste biológico en *Shewanella oneidensis* mediante mutaciones en el gen que codifica la proteína que inicia la replicación en *trfA1*, debido a una menor interacción con la helicasa DnaB (necesaria para la replicación del plásmido). El rango de hospedador de un replicón puede ser muy dinámico. La adquisición del elemento transponible por parte de pMS0506 permite la expansión a más hospedadores por parte del replicón, mientras que las mutaciones en *trfA1* restringen su rango de hospedador. Entender los mecanismos que ayudan a expandir o a restringir el rango de hospedador de los replicones también facilitará el control la diseminación de determinantes de resistencia en las poblaciones (Loftie-Eaton, Yano *et al.* 2016).

v.b) Epistasis positiva entre plásmidos

La mayor parte de los estudios que analizan las interacciones plásmido-bacteria están basados en modelos en los que las bacterias portan solamente un replicón, con excepciones escasas (Morton, Platt *et al.* 2014, San Millan, Heilbron *et al.* 2014, Loftie-Eaton, Yano *et al.* 2016). Sin embargo la presencia de un solo plásmido en una bacteria es relativamente rara, y la coexistencia de múltiples plásmidos en la misma bacteria es un proceso común en la naturaleza (San Millan, Heilbron *et al.* 2014) (ver apartado 2.4 de la introducción). Para entender la dinámica de la persistencia de los plásmidos en las poblaciones es necesario estudiar las interacciones producidas entre estos elementos genéticos móviles. La estabilidad de los replicones depende de competiciones a dos niveles diferentes. La primera competición se produce entre los propios plásmidos cohabitando dentro de una bacteria. La segunda competición se

produce entre las bacterias portando replicones y bacterias sin plásmidos (Paulsson 2002). Ambos mecanismos están en conflicto ya que un aumento del número de copias de los plásmidos y de la tasa de conjugación beneficia la competición inter-plásmidos. Sin embargo, perjudica la competición bacteriana al comprometer el *fitness* del hospedador (Fernandez-Lopez y de la Cruz 2014).

San Millán y Morton en 2013 y 2014 respectivamente analizaron las interacciones epistáticas entre plásmidos encontrados en *Pseudomonadaceae* y *Agrobacterium tumefaciens* respectivamente (Morton, Platt *et al.* 2014, San Millán, Heilbron *et al.* 2014). San Millán estudió la interacción entre 5 plásmidos conjugativos y el plásmido pequeño no movilizable pN105, mientras que Morton y colaboradores analizaron los efectos en el *fitness* de dos megaplásmidos encontrados naturalmente cohabitando (pAt y pTi). En ambos trabajos se encontró que la presencia de un replicón favorecía la adquisición de un nuevo replicón: en el trabajo de San Millán, en 4 de las 5 combinaciones estudiadas aparecían interacciones epistáticas positivas entre un plásmido conjugativo y el plásmido pequeño no movilizable pN105. El coste biológico del plásmido pequeño se reduce en la cohabitación comparado con el coste que genera cuando habita solo la célula. La interacción entre los diferentes plásmidos no tiene repercusión en la resistencia a antibióticos que confieren los replicones pero sí ayuda a estabilizar al plásmido pequeño en 4 de las 5 combinaciones. El trabajo de Morton mostró interacciones epistáticas positivas entre ambos plásmidos: pAt tenía un coste biológico de 13%, mientras que pTi tiene un coste biológico de 1%. Cuando ambos plásmidos están cohabitando el *fitness* de la bacteria se reducía en un 12%.

Como hemos visto existen diferentes mecanismos en los que la evolución compensatoria y la epistasis pueden estabilizar a los replicones en las poblaciones e incluso aumentar el rango de hospedador de los plásmidos. Mientras que la adquisición de un replicón dependerá de la bacteria, del plásmido y de la interacción con el ambiente, en ausencia de selección positiva la evolución compensatoria y la epistasis permiten la estabilidad de los replicones, manteniéndolos como un reservorio de determinantes genéticos móviles (Harrison, Dytham *et al.* 2016). Sin embargo no hay estudios que relacionen la coexistencia de los plásmidos con la evolución compensatoria.

Aumentar el conocimiento de la evolución compensatoria junto con las interacciones de los plásmidos será necesario para entender y prevenir la diseminación de resistencias mediante replicones en la naturaleza.

1.1.7. Resistencia a antibióticos en la actualidad

Desde el descubrimiento por Alexander Fleming de la penicilina en 1929 (Fleming 1929) y la introducción de los antibióticos en la práctica clínica en la década de 1940, los antibióticos han salvado millones de vidas (O'Neill 2016).

En la actualidad, los antibióticos son de vital importancia en muchas intervenciones médicas: desde intervenciones de rutina como la desinfección de heridas, a técnicas más complejas como trasplantes de órganos, terapia química en cáncer o SIDA (Gonzalez Zorn y Escudero 2012). Desafortunadamente, la aparición de bacterias multirresistentes y su diseminación supone una amenaza real para la salud humana. Se calcula que se producen actualmente 700.000 muertes anuales relacionadas con la resistencia a antibióticos y, si el problema de la resistencia a antibióticos se mantiene en la progresión actual, para 2050 se producirán 10 millones de muertes al año relacionadas con la resistencia a antibióticos (O'Neill 2016). Actualmente, las agencias de salud más importantes del mundo tratan a la resistencia a antibióticos como uno de los mayores problemas sanitarios (CDC 2013, eCDC 2014, WHO 2015). La resistencia a antibióticos no solamente supone un problema sanitario, sino también económico: se calcula que en Europa como consecuencia de las resistencias a antibióticos los pacientes hospitalarios tienen que pasar un total de 2,5 millones de días ingresados en el hospital más al año, y los gastos asociados a los días extra en el hospital superan 1,5 mil millones de euros al año. En Estados Unidos los datos superan los 35 mil millones de dólares al año por costes adicionales y 8 millones de días adicionales al año (CDC 2013, eCDC 2013).

Las poblaciones de bacterias patógenas resistentes están aumentando en los hospitales y en la comunidad. Existen tres clases de patógenos resistentes a antibióticos que están emergiendo como grandes amenazas para la salud pública (Fischbach y Walsh 2009, Rossolini, Arena *et al.* 2014) [Para más información ver el informe del Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos, donde se incluyen resúmenes de los organismos que requieren acción urgente, seria, o que su importancia comienza a ser

preocupante (CDC 2013)]: i) el *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) causa en Estados Unidos más muertes que el SIDA, el Parkinson, los enfisemas y el homicidio juntos (eCDC 2013). Es el causante de 19.000 muertes al año en Estados Unidos y genera un gasto estimado entre 3.000 y 4.000 millones de dólares de costes adicionales por cuidados sanitarios (Klevens, Morrison *et al.* 2007). ii) Las bacterias Gram-negativas multirresistentes o pan-resistentes, entre las que destacan *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Aunque son menos prevalentes que los MRSA, generan graves infecciones que no son tratables (Fischbach y Walsh 2009). Las enterobacterias resistentes a carbapenemas están consideradas como bacterias que requieren acción urgente y agresiva debido a su amenaza pública (CDC 2013). iii) *Mycobacterium tuberculosis*, causante de 170.000 muertes en 2012 (Ventola 2015), cuyo tratamiento precisa dos años de tratamientos antibiótico con serios efectos secundarios (Kim, Kim *et al.* 2008). En

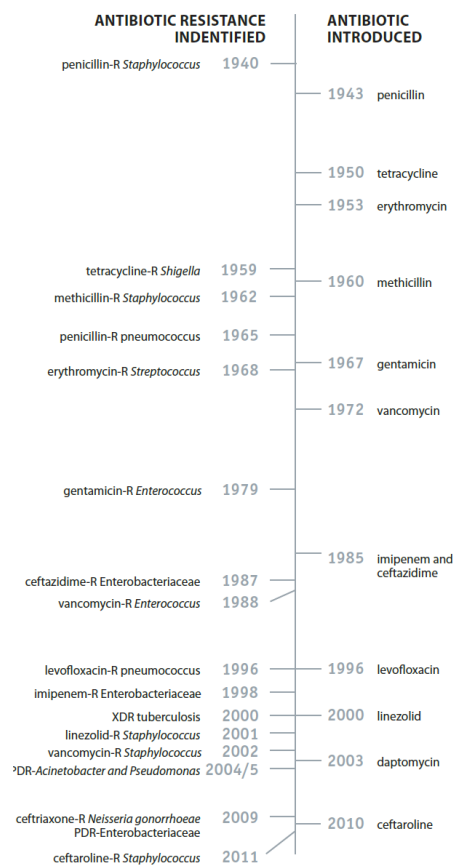


Figura 9. Cronograma del desarrollo de resistencias a antibióticos.

PDR = bacterias pan resistentes; R= bacterias resistentes; XDR = bacterias extremadamente resistentes. Figura obtenida de CDC 2013.

2012, 170.000 personas murieron por infecciones de tuberculosis resistentes a antibióticos. Existen varias causas implicadas en la crisis de la resistencia a antibióticos (Ventola 2015): el uso indiscriminado de antibióticos, la prescripción inapropiada de antibióticos, el uso extensivo de los antibióticos en la agricultura y ganadería y el escaso desarrollo de nuevos antibióticos. A estas causas hay que sumar la facilidad con la que los genes de resistencia a antibióticos persisten en la población incluso cuando no hay presión antibiótica en el medio (ver apartado 1.6 de la introducción) y la transmisión de resistencia a antibióticos mediante THG (ver capítulo 2 de la introducción).

Es sorprendente ver que, a pesar del constante incremento de los niveles de resistencia, el descubrimiento de nuevas moléculas antimicrobianas ha ido disminuyendo durante las últimas décadas (Gonzalez Zorn y Escudero 2012)

y prácticamente han aparecido resistencias para todos los antibióticos introducidos en la clínica (CDC 2013) (Figura 9). La mayoría de los esqueletos químicos de los cuales derivan los antibióticos fueron introducidos entre las décadas de 1930 y 1960. Exceptuando la introducción de los antibióticos carbapenémicos en 1985, todos los antibióticos aprobados para la clínica desde la década de los 60 hasta el siglo XXI fueron derivados sintetizados a partir de antibióticos previamente utilizados (Fischbach y Walsh 2009). Puesto que el descubrimiento de nuevas moléculas está siendo demasiado lento comparado con la diseminación de resistencias, actualmente no existen perspectivas esperanzadoras en este campo. El conocimiento de las bases moleculares de la resistencia a antibióticos es crucial para evitar la adquisición de las resistencias y dificultar la diseminación de las mismas (Gonzalez Zorn y Escudero 2012). Aumentar la investigación básica que define las condiciones y los factores que promueven la movilización y la selección de los determinantes de resistencia y el posterior movimiento de las bacterias resistente entre el ambiente, los animales y los humanos será crucial para controlar la resistencia a antibióticos y diseñar estrategias que puedan ayudar a prevenir su diseminación (Bush, Courvalin *et al.* 2011).

1.2. Plásmidos tipo ColE1

1.2.1. Transferencia horizontal de genes

La THG es la transmisión de material genético entre bacterias de un modo independiente a la replicación (transferencia vertical). De este modo, las bacterias pueden intercambiar información genética tanto con individuos de su especie como con individuos de otras especies, géneros o familias (Maiden 1998). Dado que es imposible entender la emergencia, diseminación y permanencia de la resistencia a antibióticos sin la THG, ya ha sido introducida brevemente en las secciones 1.3, 1.4, 1.6 y 1.7. La THG es el principal mecanismo de variabilidad genética en las poblaciones bacterianas ya que movilizan genes accesorios dentro de las comunidades bacterianas (Ochman, Lawrence *et al.* 2000, Gogarten y Townsend 2005, Soucy, Huang *et al.* 2015).

Los principales mecanismos de transferencia horizontal son: i) conjugación, ii) transformación y iii) transducción (von Wintersdorff, Penders *et al.* 2016) (Figura 10).

- i) La conjugación implica un contacto directo célula-célula, en el que en la célula donadora se genera una copia del plásmido y esta copia es transferida a través del sistema de conjugación tipo IV a una célula receptora. Los genes codificados para la conjugación habitualmente están codificados en plásmidos conjugativos. La transferencia se inicia con un corte en el ADN del plásmido que genera una cadena sencilla, y esta cadena sencilla se transfiere a la célula receptora. La cadena sencilla no transferida es recircularizada en la bacteria donadora. Mediante la conjugación, la bacteria receptora adquiere todos los determinantes portados en el replicón. Existen plásmidos no-conjugativos que son capaces de transferirse utilizando la maquinaria genética de los plásmidos conjugativos.

- ii) La transformación es el proceso de adquisición, y expresión funcional de ADN que se encuentra libre en el medio. Para que se produzca la transformación, la bacteria receptora debe estar en un estado denominado “competencia” –estado en el que la bacteria es capaz de captar naturalmente ADN- y el ADN ha de ser estabilizado o mediante integración en el genoma o mediante circularización.

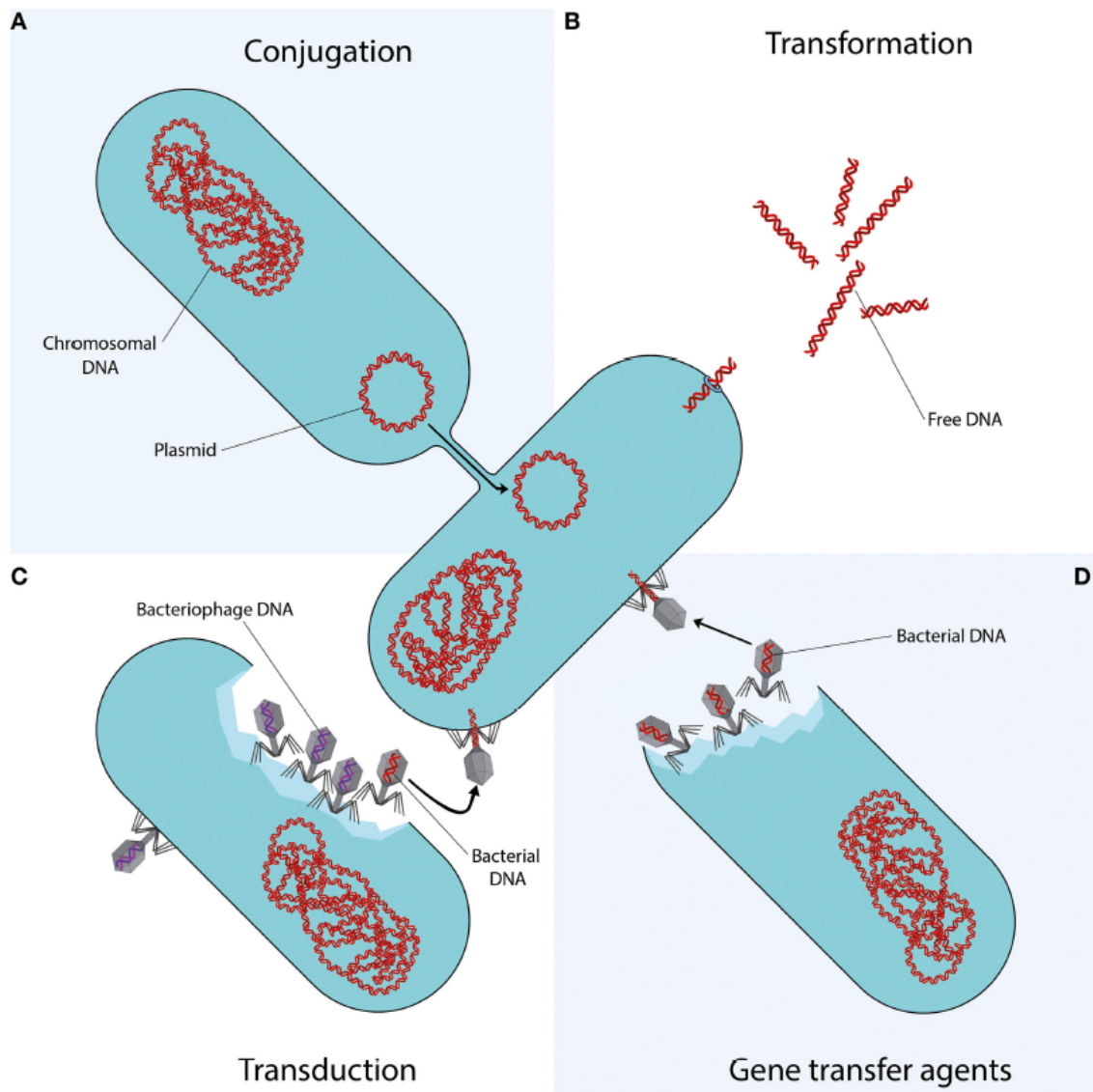


Figura 10. Mecanismos de transferencia horizontal de genes.

Cada cuadrante representa un método diferente de transferencia horizontal: a) Conjugación, b) Transformación, c) transducción especializada y d) transducción mediante agentes de transferencia de genes. Imagen obtenida de von Wintersdorff, Penders *et al.* 2016.

- iii) La transducción es la movilización de genes mediante bacteriofagos. Los bacteriofagos captan ADN de la bacteria donadora, y tras su lisis, infectan otras bacterias movilizándolo el ADN de la célula lisada. La transducción

especializada ocurre cuando un profago activado carga ADN genómico que se encuentra cerca del ADN del propio profago, y lo empaqueta junto con su propio ADN. Existe un tipo de transducción que está mediada por agentes de transferencia de genes. Estos agentes son profagos que no reconocen su propio ADN y solamente llevan fragmentos al azar del ADN del hospedador. Como los profagos, ellos residen en el genoma celular.

El éxito de un determinante de resistencia a nivel molecular depende de su capacidad de movilización. Los plásmidos juegan un papel importante en la movilización de genes entre células. Los genes de resistencia a antibióticos habitualmente están asociados con elementos conjugativos como son los plásmidos o los transposones (Norman, Hansen *et al.* 2009). Como hemos visto, gran parte de los genes de resistencia en patógenos hospitalarios se encuentran codificados en plásmidos que contienen transposones, integrones o secuencias de inserción (Allen, Donato *et al.* 2010). Las características intrínsecas de los plásmidos como pueden ser el rango de hospedador, el grupo de incompatibilidad o su capacidad conjugativa, influyen directamente en la velocidad de diseminación de las resistencias que ellos portan (Gonzalez Zorn y Escudero 2012).

Los plásmidos son ADN extracromosómico con replicación autónoma independiente del cromosoma bacteriano (Phillips y Funnell 2004). Los plásmidos son replicones modulares compuestos por un esqueleto principal en el que se codifican los elementos necesarios para la conjugación, segregación y replicación, y genes “accesorios” que codifican genes habitualmente beneficiosos para la bacteria portadora. La replicación del plásmido implica una región en el ADN del plásmido conocida como origen de replicación (*oriV*) y a proteínas del hospedador (como polimerasas o ARNts). La replicación es la única función necesaria y común a todos los plásmidos (Harrison y Brockhurst 2012). Los plásmidos regulan su número de copias mediante sistemas de regulación negativa codificados en el mismo plásmido. Se han descrito tres sistemas principales de regulación de la replicación plasmídica (del Solar y Espinosa 2000): i) secuencias de ADN con repeticiones directas (iterones) que interactúan con las proteínas iniciadoras de la replicación (Rep), ii) ARNs antisentido que hibridan mediante complementariedad con un ARN esencial iniciador de la replicación y iii) ARNs de interferencia con proteínas implicadas en el control del número de copias del plásmido.

Los plásmidos de bajo número de copias portan sistemas de segregación activa, que actúan para minimizar las pérdidas de plásmido durante la replicación celular. Estos sistemas se encargan de “empujar” a los replicones a los polos bacterianos –de un modo similar a lo que ocurre en la mitosis- antes de que se produzca la duplicación celular. Además los plásmidos, para evitar su pérdida, pueden portar sistemas toxina/antitoxina que producen una toxina más estable que la antitoxina, de tal modo que, si el plásmido se pierde, la toxina se mantiene en la célula provocando la muerte celular (Harrison y Brockhurst 2012).

Los plásmidos se pueden clasificar atendiendo a su capacidad conjugativa en tres grandes grupos (de la Cruz, Frost *et al.* 2010): i) no transmisibles, incapaces de conjugarse; ii) conjugativos, poseen todos los elementos necesarios para realizar la conjugación: las proteínas del sistema de secreción tipo IV, proteínas acopladoras y relaxasas, y iii) movilizables, poseen solamente las relaxasas, pero son capaces de explotar la maquinaria conjugativa de otros elementos conjugativos presentes en la célula. Desde un punto de vista de tamaño, los plásmidos conjugativos miden alrededor de 100 kilobases (Kb), mientras que los movilizables tienen un tamaño medio de 5 Kb (Smillie, Garcillan-Barcia *et al.* 2010).

Debido a su tamaño, los plásmidos conjugativos pueden codificar simultáneamente múltiples determinantes de resistencia, comprometiendo así la eficacia de varios antibióticos en un solo proceso de THG. La mayor parte de los trabajos relacionados con la diseminación de resistencias a antibióticos mediada por plásmidos han sido desarrollados con plásmidos conjugativos. Sin embargo, recientemente han empezado a aparecer trabajos en los que se pone de manifiesto la implicación de plásmidos movilizables de pequeño tamaño en la resistencia a antimicrobianos (Kehrenberg y Schwarz 2000, Cao, Lambert *et al.* 2002, Hanglord, Stang *et al.* 2009, San Millan, Escudero *et al.* 2009, San Millan, Escudero *et al.* 2009, Zioga, Whichard *et al.* 2009, Chen, Strobaugh *et al.* 2010, Pallecchi, Riccobono *et al.* 2010, San Millan, Garcia-Cobos *et al.* 2010, Tristram, Littlejohn *et al.* 2010, Pallecchi, Riccobono *et al.* 2011, Moleres, Santos-López *et al.* 2015).

En este trabajo nos centraremos en el papel de los plásmidos movilizables tipo ColE1 en la resistencia antimicrobiana.

1.2.2. Plásmidos tipo ColE1

Los plásmidos tipo ColE1 son aquellos cuya replicación está mediada por dos ARNs (Phillips y Funnell 2004). Son plásmidos movilizables, multicopia y sin sistema de segregación activo. El primer plásmido descrito con este sistema de replicación fue el plásmido ColE1 (Tomizawa, Ohmori *et al.* 1977). Actualmente, se han descrito plásmidos tipo ColE1 en la familia Pasteurellaceae, Enterobacteriaceae y recientemente en la familia Vibrionaceae (Pan 2010) –debido a las pocas referencias sobre plásmidos tipo ColE1 en la familia Vibrionaceae, en esta tesis nos centraremos en la descripción de los plásmidos tipo ColE1 en las familias Pasteurellaceae y Enterobacteriaceae- (Figuras 12 y 13). El 15% de los plásmidos depositados en GenBank descritos en la clase Gammaproteobacteriaceae corresponde a plásmidos tipo ColE1 (Shintani, Sanchez *et al.* 2015). Los plásmidos tipo ColE1 son replicones multicopia, cuya estabilidad depende directamente de su número de copias, ya que no portan elementos estabilizadores en su secuencia (Ayala-Sanmartin y Gomez-Eichelmann 1989, Reyes-Lamothe, Tran *et al.* 2014), son de pequeño tamaño (inferiores a 13 kb) y en general movilizables -la mayor parte de ellos portan relaxasas y/o orígenes de transferencia putativos- (Phillips y Funnell 2004).

Estos replicones constan de dos regiones claramente diferenciadas (Figuras 12 y 13): i) región conservada, en la que se porta la maquinaria necesaria para la replicación y la movilización del plásmido, es decir, los dos ARNs antisentido y la proteína Rop –los que la portan-, las relaxasas si las tuvieran, y el *oriT*, si lo tuvieran; y ii) región variable, en la que se portan, en la gran mayoría de ellos, elementos genéticos como pueden ser genes de resistencia a antibióticos, elementos de inserción y sistemas toxina/antitoxina.

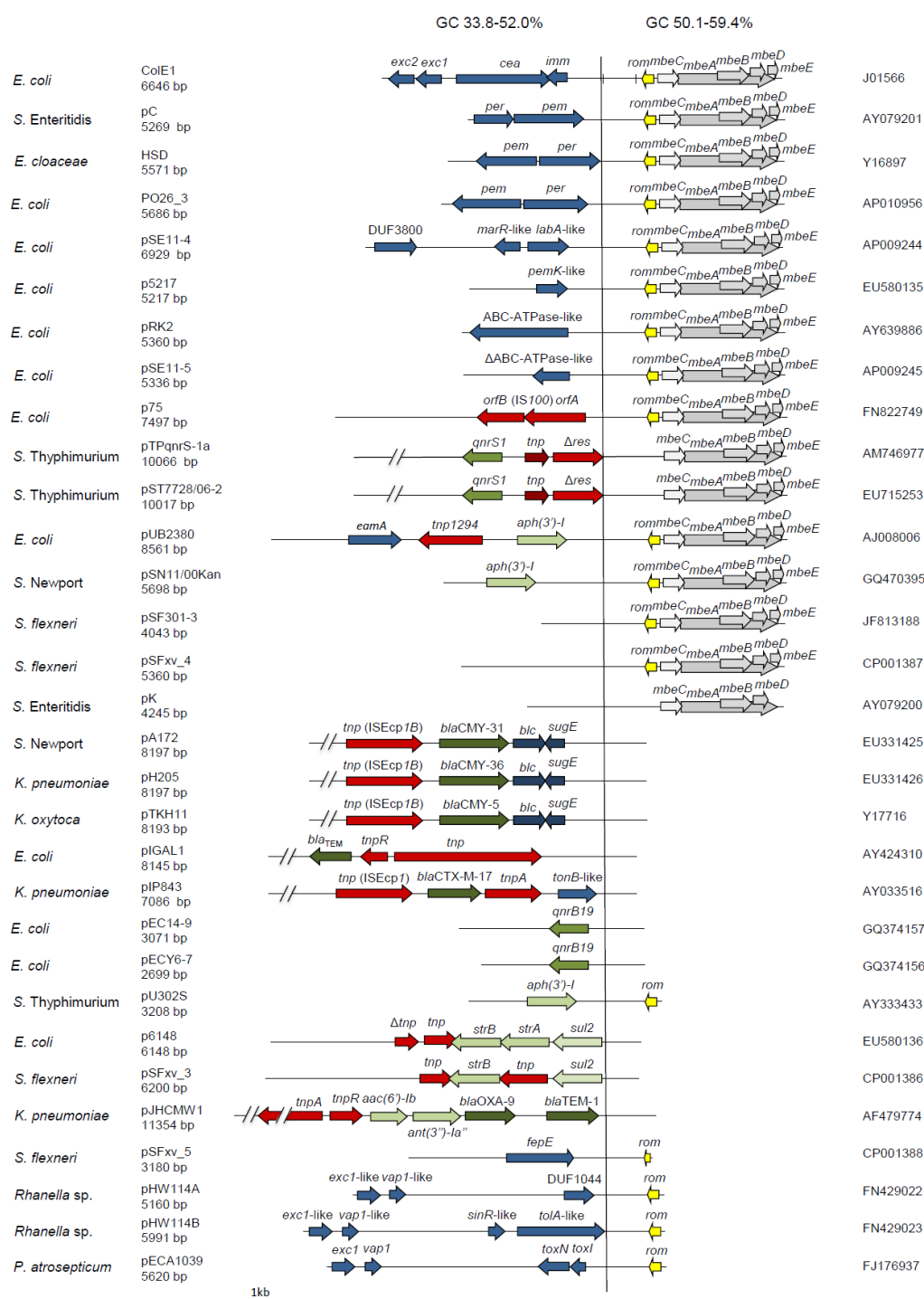


Figura 11. Plásmidos ColE1 en la familia Enterobacteriaceae

Representación esquemática de 31 plásmidos ColE1 descritos en Enterobacteriaceae. Los marcos de lectura abiertos de los genes se indican mediante flechas, la punta de la flecha indica la dirección de la transcripción. Flechas verdes: genes de resistencia a antibiótico; flechas grises: genes codificantes de las relaxasas; flechas amarillas: gen *rom*; flechas rojas: genes involucrados en la transposición e integración; flechas azules: resto de marcos de lectura abiertos. El nombre de los genes, o el nombre de la familia de proteínas que codifican, están indicados. Las dos barras verticales a la izquierda de los genes de movilización de ColE1 comprenden el origen de replicación (*oriV*). La línea vertical separa la región conservada del plásmido (derecha) y la variable (izquierda). Los rangos de porcentajes de GC están indicados en la parte superior de la figura. Las especies en las que han sido descritos los plásmidos, el nombre y el tamaño [medido en pares de bases (pb)] de los replicones así como el número de acceso a GenBank están indicados en la figura.

Numerosos trabajos ponen de manifiesto la implicación de plásmidos movilizables de pequeño tamaño en la resistencia antibiótica. Los plásmidos tipo ColE1 son vectores idóneos para la diseminación de genes (de resistencia a antibióticos) debido a 3 características: i) región altamente conservada y adaptada a los hospedadores en los que se encuentran, y que a su vez permite la dispersión de estos replicones cuando existen elementos conjugativos en la célula, ii) región variable en la que se portan secuencias de inserción capaces de movilizar genes entre plásmidos y entre plásmidos-cromosomas y iii) alta capacidad de cohabitación. En los siguientes apartados profundizaremos en cada una de las características descritas anteriormente.

1.2.3. Región conservada de los plásmidos tipo ColE1

La región conservada de los plásmidos tipo ColE1 es el esqueleto principal de los mismos. En esta región se portan los elementos necesarios para la replicación del replicón, es decir, los ARNs implicados en la duplicación plasmídica y los elementos necesarios para la movilización de estos replicones. La región conservada de los plásmidos tipo ColE1 está implicada en procesos determinantes para la biología y mantenimiento de estos plásmidos en las poblaciones bacterianas. El tamaño medio de la región conservada es de aproximadamente 2500 pb (desviación estándar aproximadamente 750 pb) y de 1870 pb (desviación estándar de 1180 pb) en los plásmidos tipo ColE1 descritos en Pasteurellaceae y Enterobacteriaceae respectivamente (TFM).

El estudio *in silico* de la región conservada muestra que existe una gran similitud estructural entre los plásmidos tipo ColE1 de Enterobacteriaceae y Pasteurellaceae. Además, existe un alto grado de similitud entre las regiones conservadas de los replicones de la familia Pasteurellaceae -97 % de identidad de secuencia- y la familia Enterobacteriaceae -80,6% de identidad-; sin embargo, la región conservada de los plásmidos de ambas familias no se parece nucleotídicamente. El hecho de que se aprecie una mayor diversidad en tamaño y en identidad nucleotídica en Enterobacteriaceae sugiere que han evolucionado durante más tiempo que los plásmidos de la familia Pasteurellaceae, pudiendo indicar que los plásmidos tipo ColE1 son originarios de la familia Enterobacteriaceae.

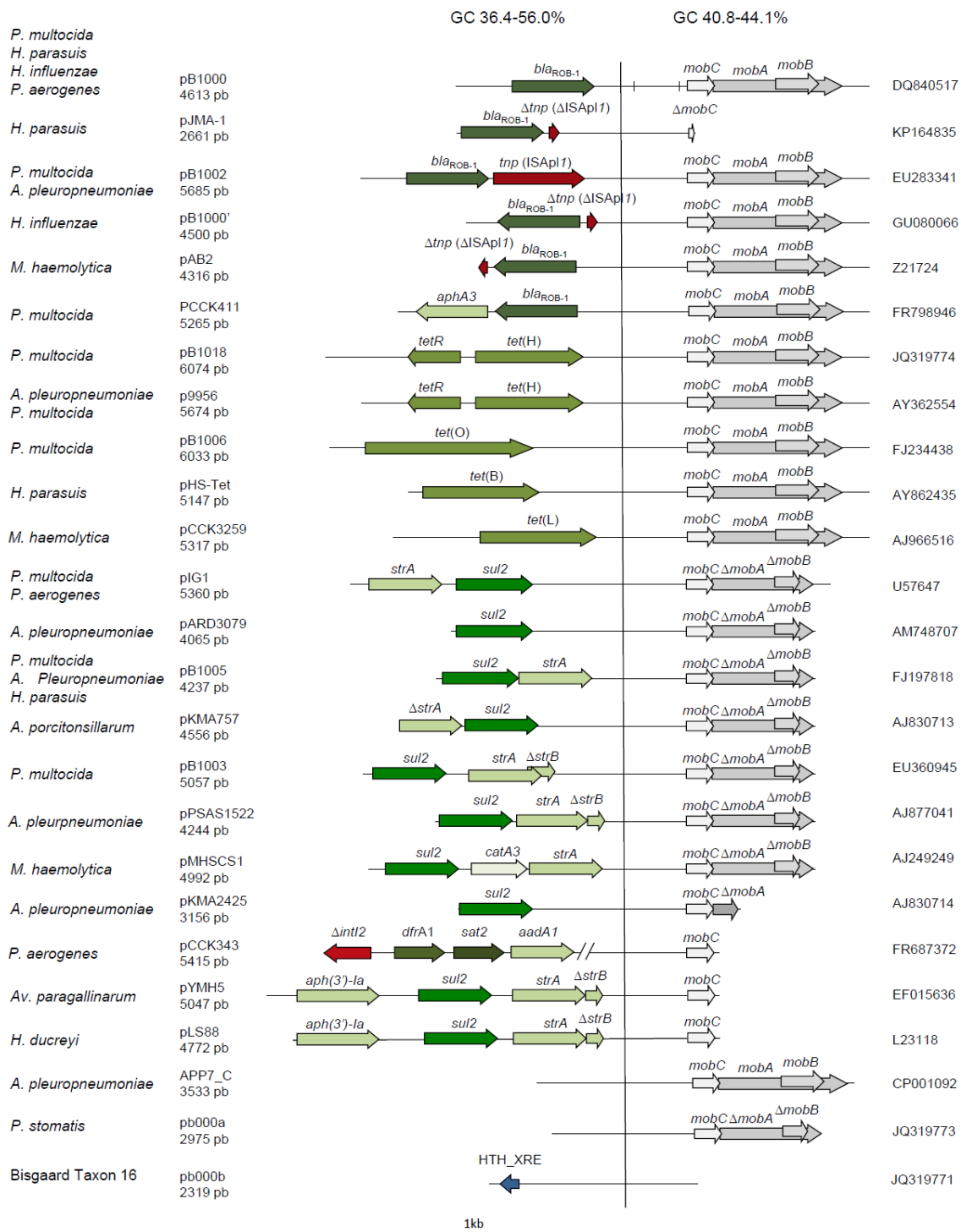


Figura 12. Plásmidos ColE1 en la familia Pasteurellaceae.

Representación esquemática de los plásmidos ColE1 descritos en Pasteurellaceae. Los marcos de lectura abiertos de los genes se indican mediante flechas, la punta de la flecha indica la dirección de la transcripción. Flechas verdes: genes de resistencia a antibiótico; flechas grises: genes implicados en la movilización; flechas rojas: genes involucrados en la transposición e integración. Las dos barras verticales a la izquierda de los genes de movilización de pB1000 comprenden el origen de replicación (*oriV*). La línea vertical separa la región conservada del plásmido (derecha) y la variable (izquierda). Los rangos de porcentajes de GC están indicados en la parte superior de la figura. Las especies en las que han sido descritos los plásmidos, el nombre y el tamaño [medido en pares de bases (pb)] de los replicones así como el número de acceso a GenBank están indicados en la figura.

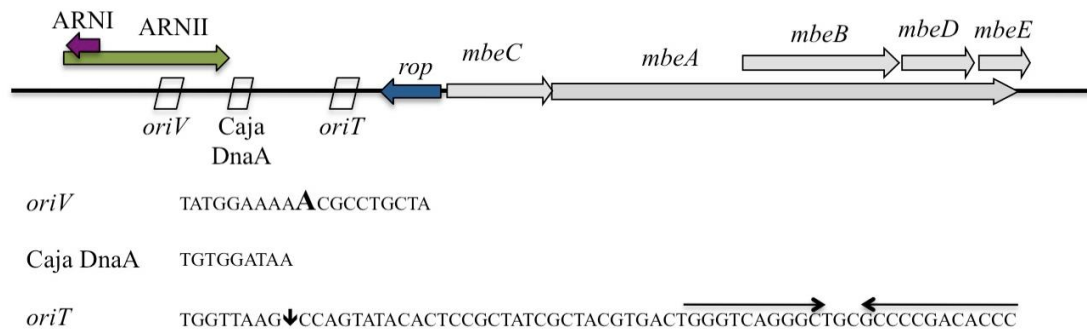
El porcentaje en G+C de la región conservada de los plásmidos tipo ColE1 de la familia Pasteurellaceae oscila entre el 43% y el 44%, siendo muy similar al contenido en G+C de los genomas de las especies que los portan: entre el 37% y el 44%. En Enterobacteriaceae vemos el mismo fenómeno: el porcentaje de G+C varía entre el 34 y 52% y el contenido en G+C de los genomas de las especies que los portan es muy similar: *E. coli* 50%, *Salmonella enterica* 52% y *Klebsiella pneumoniae* 57%. Estos datos indican que los plásmidos están altamente adaptados a la familia bacteriana donde han coevolucionado a lo largo del tiempo.

1.2.3.1. Replicación de los plásmidos tipo ColE1

La región conservada implicada en la regulación del número de copias de los plásmidos tipo ColE1 ha sido estudiada principalmente en el replicón del que esta familia toma su nombre: el plásmido ColE1 (número de acceso a GenBank J01566) (Tomizawa, Ohmori *et al.* 1977) (Figura 11), de 6646 pb. En esta tesis nos centraremos en plásmidos tipo ColE1 de la familia Pasteurellaceae, en concreto pB1000, pB1005 y pB1006 (número de acceso a GenBank DQ840517, FJ197818 y FJ234438 respectivamente) (San Millan, Escudero *et al.* 2009) (Figura 12). Dado que no existen trabajos que estudien el mecanismo de replicación de los plásmidos tipo ColE1 -solamente está descrita la región mínima, de 823 pb, necesaria para la replicación de los plásmidos tipo ColE1 en Pasteurellaceae (Dixon, Albritton *et al.* 1994)- y debido a la similitud estructural entre los plásmidos tipo ColE1 de Enterobacteriaceae y de Pasteurellaceae (Figura 13), explicaremos el mecanismo tomando como base el plásmido ColE1 (Camps 2010, Brantl 2014, Lilly y Camps 2015).

El origen de replicación de los plásmidos tipo ColE1 está codificado en una secuencia de unos 550 pb conocida como el origen de replicación (*oriV*). En el *oriV* está codificado un ARN de 550 nt (denominado ARNII) que forma un híbrido estable de 30 nucleótidos con el ADN plasmídico (Figura 14). El ARNII se expresa constitutivamente desde el promotor P2, potenciado por una secuencia de 9 pb - 5'AAGATCTTC- localizada corriente arriba del P2 (Wu y Liu 2010). El híbrido estable ADN-ARN se conoce como el lazo-R (*R-loop*). El lazo-R es el único elemento que es compartido y necesario para la replicación de todos los plásmidos tipo ColE1.

ColE1



pB1000

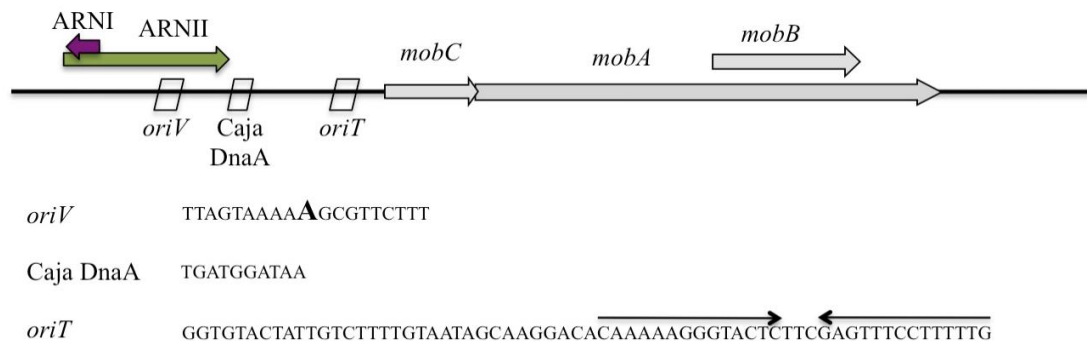


Figura 13. Comparación de la región conservada de los plásmidos tipo ColE1 prototipo de la familia Enterobacteriaceae y Pasteurellaceae.

Los marcos de lectura abiertos de los genes se indican mediante flechas, la dirección de la transcripción la indica la punta de la flecha. Los recuadros señalan el origen de replicación, la caja DnaA y el origen de transferencia. Las secuencias de estas regiones se detallan debajo. En la secuencia de los *oriT* las flechas horizontales señalan regiones de simetría inversa, mientras que las verticales señalan el punto de corte para la relajación del plásmido. Figura obtenida de San Millan 2010.

La formación del lazo-R está favorecida por una región rica en G en el pre-primer ARNII (Lilly y Camps 2015).

El lazo-R será procesado por la ARNasaH –que reconoce un motivo AAAAAA en el ARNII- para crear un extremo 3'-OH libre. La ADN polimerasa I utilizará este extremo para iniciar la cadena líder durante la síntesis del ADN en la replicación del plásmido. El posicionamiento del extremo final del precursor 3'-OH es crítico para el procesamiento del ARN y la posterior iniciación de la replicación mediada por la Pol I (Phillips y Funnell 2004, Camps 2010). Posteriormente, la Pol III será la encargada de continuar la síntesis de ADN en la cadena líder y de iniciar las síntesis de las cadenas rezagadas.

Según la revisión de Cesareni (Cesareni, Helmer-Citterich *et al.* 1991), este mecanismo está regulado negativamente en el plásmido ColE1 por un ARN antisentido de 108 nt denominado ARNI y que se transcribe de un promotor (P1) antisentido. El ARNI solapa con el extremo 5' final del primer ARNII inhibiendo por complementariedad de bases la formación del lazo-R. La inhibición de la replicación del plásmido ColE1 comienza a ocurrir cuando en la bacteria están presentes unas 16 copias del plásmido (Snyder y Champness 2007).

Esta inhibición está determinada por la formación en ambos ARNs de tres lazos que se denominan SL1, SL2 y SL3 (*Stem-Loop* 1, 2, y 3). Estos lazos acaban en 7 pares de bases desapareadas que permiten la interacción entre los lazos del ARNI y del ARNII (Wang, Yuan *et al.* 2004). Posteriormente en este proceso, el extremo 5' del ARNI potencia la unión ARNI-ARNII, unión que conforma el denominado *kissing complex*. El *kissing complex* se estabiliza mediante una proteína auxiliar codificada en el propio plásmido denominada Rop (*Repressor of the primer*) (Tomizawa 1986, Tomizawa 1990). El gen *rom* (*RNA one modulator*), que codifica la proteína Rop, no se encuentra en todos los plásmidos tipo ColE1 –por ejemplo no se encuentra en ningún plásmido tipo ColE1 de la familia Pasteurellaceae y es eliminada de la mayor parte de vectores basados en plásmidos tipo ColE1. La supresión de la actividad de la proteína Rop aumenta entre 3 y 5 veces el número de copias de un plásmido tipo ColE1 (Tomizawa y Som 1984). El *kissing complex* puede verse afectado a su vez por la interacción con ARNs libres en la bacteria, tema que será tratado posteriormente en este apartado de la introducción (Wróbel y Wegrzyn 1998, Wang, Le *et al.* 2002, Wang, Yuan *et al.* 2006, Wegrzyn y Wegrzyn 2008).

Debido que el ARNII se transcribe desde el promotor P2 y que éste es más débil que el promotor P1 del ARNI, se producen entre 15 y 30 veces más ARNI que ARNII (Freudenau, Lutter *et al.* 2015). Por tanto, la represión ejercida por el ARNI depende directamente del número de copias del replicón. Sin embargo, la regulación del número de copias es un aspecto muy dinámico –la vida media del ARNI es de 2 minutos- y responde a fluctuaciones metabólicas o incluso a la presencia de otros replicones en la célula. La ausencia del ARNI –por ejemplo bajo la delección del extremo 5' del *oriV*- genera un aumento del número de copias del plásmido (conocido como el *runaway plasmid replication*) directamente proporcional a la transcripción del promotor P2 (Panayotatos 1984).

En general, el número de copias de la familia de los plásmidos tipo ColE1 está determinado por las fuerzas relativas de los promotores P1 y P2 y por la eficiencia de la formación del *kissing complex*. Mutaciones en la secuencia de ADN en la que está codificado el ARNI pueden alterar tanto al ARNI como al ARNII, manteniendo su complementariedad pero aumentando la afinidad de la interacción. Al verse comprometida la fuerza de los enlaces implicados en el *kissing complex* gracias a las mutaciones, el número de copias de los replicones se ve alterado. Así mismo, mutaciones puntuales en esta región pueden dar lugar a nuevos grupos de compatibilidad, permitiendo la cohabitación de varios plásmidos tipo ColE1 diferenciados en el mismo hospedador (Novick 1987).

Si la transcripción del ARNII sobrepasa los 200 nt, se genera la formación de un nuevo lazo (SL4) mediante la interacción de dos dominios (α y β). La formación de este nuevo lazo impide que el ARNI se una al ARNII y por tanto, no se reprime la

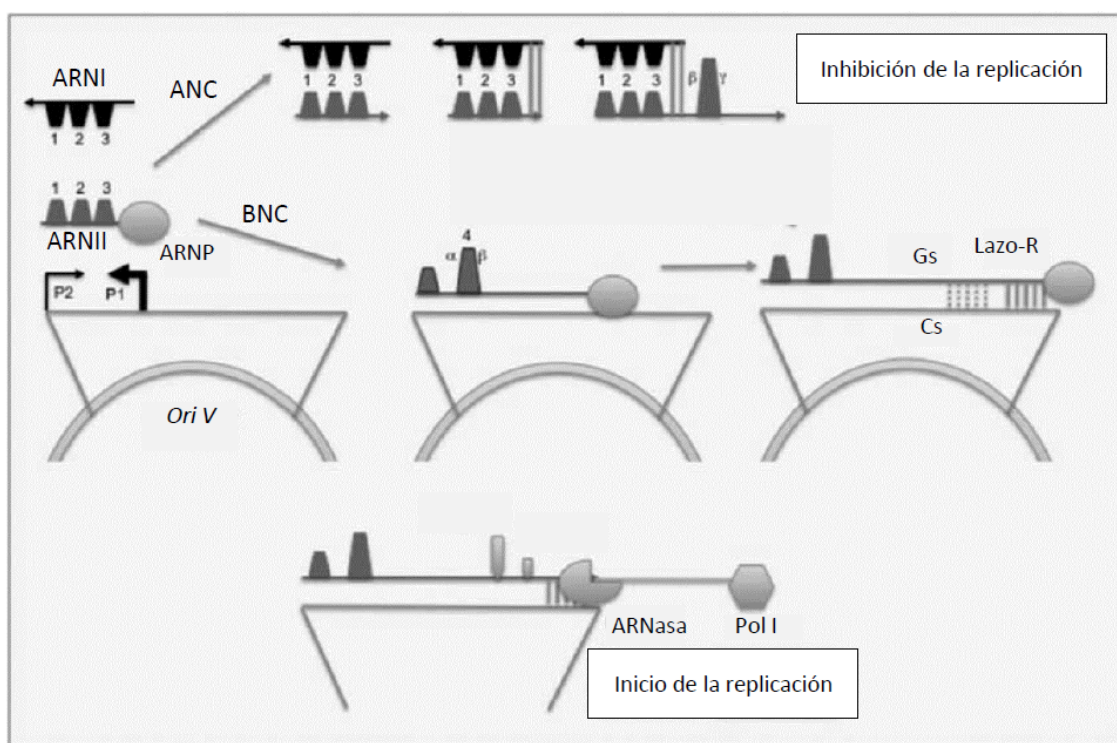


Figura 14. Representación esquemática de la replicación de los plásmidos tipo ColE1.

Cuando existe bajo número de copias (BNC), el ARNII se transcribe mediante la ARN polimerasa (ARNP) desde el promotor P2. Si el transcrito es mayor de 200 pb, se producirá el lazo SL4 mediante complementariedad de las secuencias α y β , impidiendo la unión del ARNI. Posteriormente se producirá la formación del lazo-R mediante la unión del ARNII y el ADN plasmídico, favorecido por una región rica en citosinas en el origen de replicación del plásmido. Una vez producido el lazo-R, actuarán la ARNasa-H dejando un residuo OH en el extremo 3' facilitando la unión de la polimerasa I (Pol I), dando así inicio a la replicación del ADN. Cuando existe un alto número de copias, el ARN I expresado desde el promotor P1, impedirá la formación del SL4 mediante complementariedad de bases formando el denominado *kissing complex*, impidiendo de tal modo la replicación. Figura modificada de Camps 2010.

replicación del plásmido. Esto genera una ventana temporal dependiente de la cinética de formación de los lazos que permite la replicación del plásmido aunque el ARNI esté mucho más concentrado en el ambiente que el ARNII (Camps 2010).

Mediante mutaciones de pérdida de función se han encontrado dominios funcionales implicados en la replicación de los plásmidos tipo ColE1: un motivo rico en AT entre las cajas -35 y -10 importante para la actividad de los promotores, una región rica en Gs en el ARNI –y su consecuente región rica en Cs en el ADN plasmídico-, que ayuda a la formación del lazo-R y dos estructuras en forma de horquilla a lo largo del extremo 3' del ARNII. La primera horquilla es importante para el procesamiento y extensión del ARNII, mientras que la segunda juega un papel importante en la formación del lazo-R (Masukata y Tomizawa 1984, Naito, Kitani *et al.* 1984).

1.2.3.2. Factores del hospedador que afectan a la replicación

Aunque estamos hablando de la región conservada de los plásmidos tipo ColE1, es necesario que mencionemos los factores del hospedador que intervienen en la replicación de los plásmidos tipo ColE1 y cuya ausencia/presencia o secuencia nucleotídica pueden afectar directamente al número de copias de los plásmidos tipo ColE1: proteínas implicadas en la síntesis, procesamiento y poliadenilización de los ARNs, como la ARN polimerasa, la ARNasaH o la PcnB; proteínas implicadas en la síntesis de la cadena líder, como las ADN polimerasas I y III; y proteínas implicadas en la formación de la horquilla de la replicación, como por ejemplo PriA (Wang, Yuan *et al.* 2004, Camps 2010).

Resulta de gran relevancia el papel que toman los ARNts en la modulación del número de copias de los plásmidos tipo ColE1. En 1988 se observó la existencia de homología entre los ARNI, ARNII y los ARNts (Yavachev y Ivanov 1988). Numerosos estudios han puesto de manifiesto la relación entre los ARNts y los ARNs implicados en la regulación del número de copias de los plásmidos tipo ColE1 (ver revisión (Wegrzyn y Wegrzyn 2008)). Existen dos modelos propuestos en los que los ARNts no cargados de aminoácidos pueden estar afectando al número de copias de los plásmidos tipo ColE1:

- i) Interacción directa entre el anticodón del ARNt y los lazos del ARNI o del ARNII. Dado que la complementariedad entre los ARNI-ARNII es total, y solamente parcial entre los ARNt-ARNI/II, para que se produzca la interacción ARNt-ARNI/II debe haber una gran concentración de ARNts libres en la célula, por ejemplo, en medios carentes de ciertos aminoácidos. La interacción ARNt-ARNs se dará solamente mediante uniones directas del anticodón del ARNt y los lazos de los ARNI/II, y dependerá de la secuencia de ambos ARNs (Wróbel y Wegrzyn 1998). El efecto sobre la replicación del plásmido dependerá directamente de la fuerza de interacción entre el anticodón del ARNt y los ARNs plasmídico. Tanto en uniones ARNt-ARNI como en uniones ARNt-ARNII se producirá un aumento del número de copias del replicón. La unión ARNII-ARNt no supone un cambio conformacional del pre-primer, y por tanto éste se puede unir al ADN y formar el lazo-R. Por su parte, la unión ARNt-ARNI impide la formación del *kissing complex* y así aumenta igualmente el número de copias de los replicones (Wróbel y Wegrzyn 1998, Wang, Le *et al.* 2002, Wegrzyn y Wegrzyn 2008).

- ii) El ARNt^{Ala}(UGC) es capaz de escindir *in vitro* e *in vivo* tanto el ARNI como el ARNII mediante la hibridación del extremo 3'-CCA del ARNt con la secuencia -GGU encontrada en los lazos 2 y 3 de los ARNI o ARNII (Wang, Le *et al.* 2002, Wang, Yuan *et al.* 2006). Tanto si la secuencia -GGU se encuentra en el ARNI como si se encuentra en el ARNII, se producirá el fenómeno conocido como *runaway plasmid replication*, pero el efecto final del mismo dependerá de la localización de dicha secuencia: en los plásmidos pMB1 (Bhagwat y Person 1981) y RSF1030 (Número de acceso a GenBank J01784), la escisión se produce en el ARNII produciéndose una desregulación total del número de copias; mientras que en los plásmidos PIGDM1(número de acceso a GenBank AF014880) y CloGL13 (número de acceso a GenBank NC_002119) la escisión se produce en el ARNI; y dado que el ARNI es más abundante que el ARNII, el efecto de la desregulación del número de copias dependerá de la abundancia relativa del ARNt y del ARNI (Wang, Yuan *et al.* 2006, Wegrzyn y Wegrzyn 2008).

1.2.3.3. Movilización de los plásmidos tipo ColE1

La otra región funcional codificada en la parte conservada de los plásmidos tipo ColE1 es aquella encargada de la movilización de esta familia de replicones. Los plásmidos movilizables –como los tipo ColE1- pueden ser movilizados por otros plásmidos conjugativos o por bacterias que portan el sistema de secreción tipo IV en el cromosoma. Los plásmidos movilizables pueden formar el relaxosoma –complejo ADN-proteínas compuesto por el origen de transferencia (*oriT*) y las proteínas relaxasas (Mob/Mbe)- que se une a la proteína acopladora y permitiendo su transmisión por conjugación (Francia, Varsaki *et al.* 2004). Se ha descrito que la secuencia de los genes que codifican las relaxasas son una buena herramienta filogenética para la clasificación de los plásmidos (Francia, Varsaki *et al.* 2004) y, de acuerdo a esta clasificación, los plásmidos tipo ColE1 y pB1000 pertenecen a la familia MOB_{HEN} (o MOB_{p5}) dentro de la familia MOB_p (Figura 15) (Varsaki, Lucas *et al.* 2003). Las relaxasas codificadas en los plásmidos tipo ColE1 inician la movilización mediante el reconocimiento del *oriT*, donde realizan un corte en una de las dos cadenas del ADN del plásmido. Tras el corte en el *nick site* (sitio de corte), el ADN plasmídico se relaja –razón por la cual las proteínas movilizadoras se denominan relaxasas- y se produce un enlace covalente entre el extremo 5' del ADN y el residuo catalítico de la relaxasa, formándose el relaxosoma. Tras la formación del relaxosoma la proteína acopladora acerca el plásmido al sistema de secreción tipo IV, donde se producirá la conjugación (Phillips y Funnell 2004).



Figura 15. Alineamiento de MbeA y MobA.

Los recuadros conservados están representados de azul oscuro y los variables de azul claro. El corchete a la izquierda de la figura engloba el dominio con actividad relaxasa de las proteínas. Los motivos I, II y III de este dominio aparecen indicados. Los residuos (H), ácido glutámico (E) y asparagina (N), están recuadrados en rojo. Figura obtenida de San Millan 2010.

La maquinaria encargada de la movilización de los plásmidos tipo ColE1 ha sido ampliamente estudiada en los replicones pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. En la familia Pasteurellaceae solamente existen dos trabajos que describan la implicación de las relaxasas en la movilización de los plásmidos tipo ColE1 (Wright, Strugnell *et al.* 1997, Blanco, Kadlec *et al.* 2007). El plásmido ColE1 ha sido movlizado eficientemente por los plásmidos conjugativos IncF1, IncI1, IncP e IncW (Cabezón, Sastre *et al.* 1997). En la familia Pasteurellaceae, el plásmido pB1000, sobre el que versa este trabajo principalmente, ha sido movlizado en *Escherichia coli* por un plásmido IncP (San Millan, Escudero *et al.* 2009).

La región implicada en la movilización –región *mob*- del plásmido ColE1 está bien caracterizada y consiste en un *cluster* de 5 genes (*mbeA* –B, –C, –D y –E) (Figura 11). La localización del origen de transferencia *oriT*, así como del sitio de corte y la funcionalidad de MbeA, han sido probadas experimentalmente (Varsaki, Lamb *et al.* 2012). MbeB forma parte del relaxosoma, mientras que recientemente se ha demostrado que MbeC ayuda activamente a la relaxasa MbeA a unirse al ADN en el sitio *nick* (Varsaki, Lamb *et al.* 2012). MbeD es probablemente una proteína de exclusión plasmídica (Yamada, Yamada *et al.* 1995).

pB1000 porta solamente 3 relaxasas (*mobA*, *mobB*, y *mobC*) (Figura 12). En Pasteurellaceae no existen trabajos detallando la función de cada una de las proteínas de la región *mob*. Sin embargo, existe homología estructural entre *mbeABC* y *mobABC* (Figura 11), sobre todo entre las proteínas *mbeA* y *mobA*, ya que ambas mantienen conservados los cuatro aminoácidos esenciales para la actividad relaxasa Y19, H97, E104 y N106 (Figura 15) (Varsaki, Lucas *et al.* 2003). Además se ha demostrado la movilización de plásmidos portando *mobABC*, como por ejemplo es el caso de pB1000 (San Millan, Escudero *et al.* 2009) o de p9956 (Blanco, Kadlec *et al.* 2007), lo que nos hace pensar que la movilización de plásmidos tipo ColE1 en Pasteurellaceae y Enterobacteriaceae se basan en el mismo principio.

El *oriT* es el único elemento necesario en *cis* para que se produzca la movilización de un replicón -existen ejemplos de movilización de replicones sin relaxasas con *oriT* putativos (Bellanger, Guilloteau *et al.* 2014, O'Brien, Yui Eto *et al.* 2015)-. Los *oriT* son secuencias de entre 30 y 500 pb que contienen el sitio de corte y elementos implicados en la interacción ADN-proteína tales como secuencias repetidas y regiones ricas en A+T. El plásmido en el que más se ha estudiado el *oriT* en la familia de los plásmidos tipo ColE1 es de nuevo el plásmido ColE1 (Boyd, Archer *et al.* 1989, Varsaki, Lucas *et al.* 2003, Phillips y Funnell 2004), de manera que los demás orígenes de transferencia en plásmidos tipo ColE1 se han asignado basándose en similitud de secuencia con el mismo. En el caso del plásmido pB1000, el origen de transferencia ha sido caracterizado mediante el estudio de su secuencia, ya que la similitud nucleotídica entre pB1000 y ColE1 es escasa. En concreto, la presencia de una región de simetría inversa, necesaria para el reconocimiento por parte de las relaxasas, ha sido determinante para conocer su localización (Figura 13). Sin embargo, el residuo de corte del plásmido no ha sido determinado.

1.2.4. Región variable de los plásmidos tipo ColE1

Consideramos región variable de los plásmidos tipo ColE1 a la zona en la que se codifican los distintos determinantes portados por estos replicones que no están involucrados ni en la replicación ni en la movilización (Figuras 12 y 13).

Recordemos que la región conservada de los plásmidos tipo ColE1 tenía un contenido en G+C similar al de los genomas de las bacterias que portan estos

replicones. Si analizamos la región variable de los plásmidos tipo ColE1, comprobamos que el porcentaje en G+C de esta zona es mucho más variable: entre 38 y 53% para los plásmidos en Pasteurellaceae y entre 37 y 53% para los plásmidos descritos en la familia Enterobacteriaceae. La variabilidad mostrada en esta región se debe a los diferentes orígenes de los genes que están codificados en ella.

1.2.4.1. Secuencias de inserción

En esta diversidad genética toman un papel muy importante las secuencias de inserción (*Insertion Sequence*, IS). La movilización de genes mediante ISs ha sido altamente descrita en la familia Enterobacteriaceae (Poirel, Decousser *et al.* 2003, Revilla, Garcillán-Barcia *et al.* 2008, D'Andrea, Literacka *et al.* 2011, Sousa, Bourgard *et al.* 2013, Stoesser, Sheppard *et al.* 2016). Las IS, también llamadas transposones simples o sencillos, son elementos genéticos móviles implicados en eventos de transposición. La transposición es la capacidad de algunos elementos genéticos de moverse de forma semi-autónoma a lo largo de los genomas. Las ISs están formadas por una proteína denominada transposasa –encargada de la transposición- que se encuentra flanqueada por dos terminaciones inversas repetidas (IRs) (Siguier, Gournbeyre *et al.* 2015).

Un ejemplo clásico de la movilización de genes de resistencia entre plásmidos tipo ColE1 y cromosomas determinada por ISs es la circulación de alelos de *bla*_{CMY-2} desde el cromosoma de *Citrobacter freundii* a los plásmidos pTKH11 de *K. oxytoca*, pA172 de *S. Newport* y pH205 de *K. pneumoniae* (Números de acceso a GenBank Y17716, EU331425 y EU331426 respectivamente) (Poirel, Decousser *et al.* 2003, Zioga, Whichard *et al.* 2009, D'Andrea, Literacka *et al.* 2011). La estructura genética de dichos plásmidos -compuesta por la secuencia de inserción ISEcp1, la β -lactamasa y dos genes –*blc* y *sugE*, que codifican una lipocalina y una proteína de multirresistencia respectivamente (Figura 11)- indica que la IS movilizó los cuatro genes desde el cromosoma de *C. freundii* a estos plásmidos tipo ColE1 (Poirel, Decousser *et al.* 2003). Posteriormente este mismo cluster genético se ha encontrado en nuevas especies bacterianas como por ejemplo *Proteus mirabilis* (D'Andrea, Literacka *et al.* 2011) o *E. coli* (Stoesser, Sheppard *et al.* 2016) y se argumenta su movilización mediante plásmidos tipo ColE1.

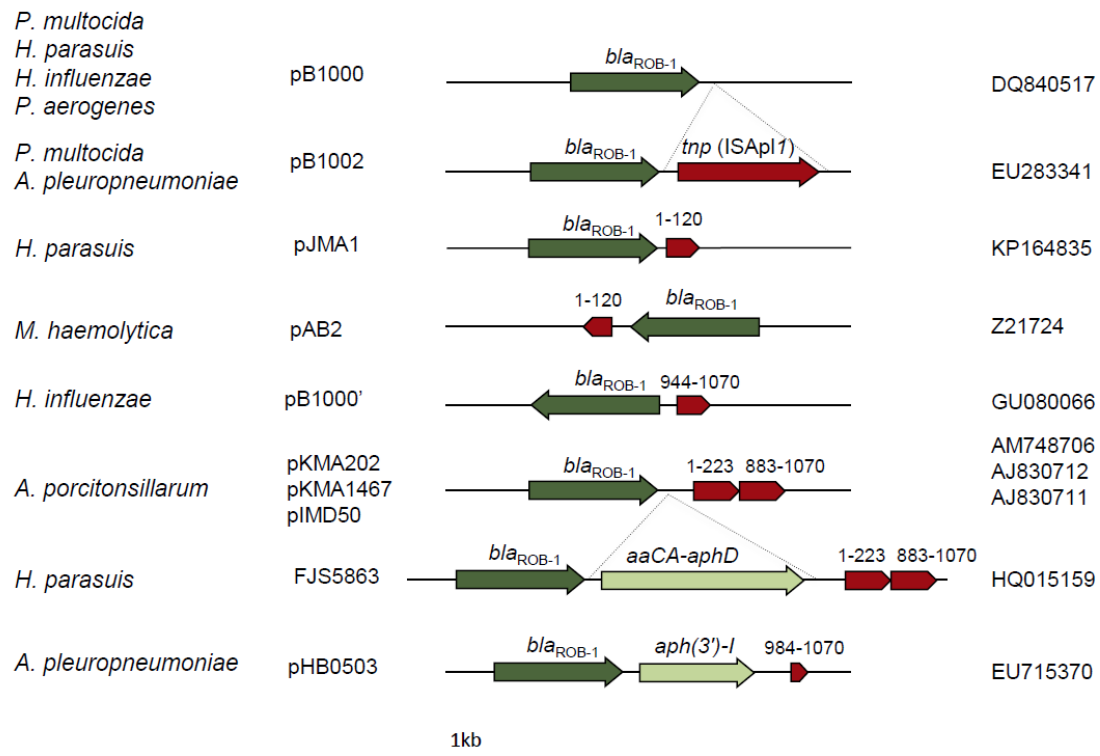


Figura 16. Asociación de *bla*_{ROB-1} e IS*AplI* en plásmidos de la familia Pasteurellaceae.

Esquema comparando varios plásmidos *bla*_{ROB-1} junto con IS*AplI*. Los marcos de lectura abiertos de los genes se indican mediante flechas, la punta de la flecha indica la dirección de la transcripción. Los marcos de lectura abiertos se indican mediante flechas, la punta de la flecha indica la dirección de la transcripción. Flechas verdes: genes de resistencia a antibiótico; flechas rojas: genes involucrados en la transposición. La flecha IS*AplI* incluye las repeticiones invertidas así como el transposón. Los pentágonos rojos indican fragmentos de IS*AplI*, y el número encima indica los nucleótidos de IS*AplI* que incluyen dichos fragmentos. Las líneas punteadas indican la inserción del gen mediante la duplicación del sitio de inserción (GACTT/CTGAA). Las especies en las que han sido descritos, los plásmidos, el nombre y el número de acceso a GenBank están indicados en la figura.

En los plásmidos tipo ColE1 de la familia Pasteurellaceae solamente aparece una secuencia de inserción completa: IS*AplI* (Liu, Tan *et al.* 2008, Tegetmeyer, Jones *et al.* 2008). IS*AplI* pertenece a la familia IS30, tiene 1070 pb e incluye una transposasa flanqueada por dos IR de 26 pb. Este elemento móvil reconoce la secuencia diana GACTT/CTGAA para llevar a cabo su recombinación (Tegetmeyer, Jones *et al.* 2008). IS*AplI* se encuentra en el plásmido pB1002 corriente abajo de la β -lactamasa *bla*_{ROB-1} (Número de acceso a GenBank EU283341) (San Millan, Escudero *et al.* 2009). El plásmido pB1000 es virtualmente igual que pB1002 con la ausencia de IS*AplI*, aunque sí se encuentra la secuencia que reconoce para realizar la transposición. También se encuentran restos de IS*AplI* en plásmidos tipo ColE1 que portan *bla*_{ROB-1}, como pB1000' –plásmido igual a pB1000 en el que la β -lactamasa ha cambiado de orientación-, el plásmido pJMA-1 y el replicón pAB2 (Número de

acceso a GenBank GU080066, Z21724 y KP164834 respectivamente) (Moleres, Santos-López *et al.* 2015) (Figuras 13 y 17). También aparecen asociaciones de IS*AplI* y *bla*_{ROB-1} en los siguientes plásmidos no ColE1: pKMA202, pKMA1467, pIMD50, FJS5863, pHB0503 y pFS39 (números de acceso a GenBank: AM748706, AJ830712, AJ830711, HQ015159, EU715370 y KC405064). Parece claro que la movilización de *bla*_{ROB-1} se ha producido desde algún cromosoma de Pasteurellaceae (solamente se ha descrito en esta familia bacteriana) mediante eventos transpositivos mediados por IS*AplI*.

1.2.4.2. Determinantes genéticos codificados en la región variable

En la familia Enterobacteriaceae encontramos determinantes implicados en la resistencia a los antibióticos más importantes utilizados en la práctica clínica: las β -lactamasas TEM-1 (Chen, Nace *et al.* 2007), CTX-M-17 (Cao, Lambert *et al.* 2002), IMP, GES, BEL (Papagiannitsis, Dolejska *et al.* 2015) y CMY (Zioga, Whichard *et al.* 2009, D'Andrea, Literacka *et al.* 2011), los genes de resistencia a fluoroquinolonas *qnrS1* (Kehrenberg, Hopkins *et al.* 2007) y *qnrB19*, las enzimas modificadoras de aminoglucósidos Aph(3')-I (Chen, Lindsey *et al.* 2010), el gen de resistencia a tobramicina y kanamicina *aac*(6')-Ib-cr4 (de Toro, Rodríguez *et al.* 2013), así como la acetiltransferasa *cat*-pAsa7 que genera resistencia a cloranfenicol (Vincent, Emond-Rheault *et al.* 2016). También encontramos diversos determinantes que no están implicados en la resistencia antibióticos. Entre ellos se encuentran genes de resistencia a fagos, genes involucrados en el transporte de hierro y genes que codifican toxinas, como por ejemplo la colicina E1 del plásmido ColE1.

Existe una gran asociación entre plásmidos tipo ColE1 y genes de resistencia a antibióticos. La gran mayoría de los plásmidos tipo ColE1 descritos en la familia Pasteurellaceae –alrededor del 92%- portan genes de resistencia a antibióticos. Los tres plásmidos tipo ColE1 que no portan determinantes de resistencia En la familia Pasteurellaceae son plásmidos crípticos: APP7_C, pB000a, pB000b (número de acceso a GeneBank CP001092, JQ319773 y JQ319771 respectivamente). Entre los determinantes de resistencia se incluyen genes descritos solamente en la familia Pasteurellaceae, como por ejemplo *bla*_{ROB-1}. También encontramos bombas de eflujo pertenecientes a la MFS como es el gen *tet*(H) (Blanco, Kadlec *et al.* 2007), la

acetiltransferasa *catA3* o la dihydrofolato reductasa *glrA14*, que confiere resistencia a trimetoprim (Bosse, Li *et al.* 2015). Estos últimos genes han sido encontrados principalmente en la familia Pasteurellaceae, aunque también se encuentran en géneros de otras familias como *Acinetobacter* y *Klebsiella*. También están codificados genes que principalmente se han descrito en Enterobacteriaceae tales como *tet(B)* (Lancashire, Terry *et al.* 2005), *strA* (San Millan, Escudero *et al.* 2009) y de otras fuentes como el protector ribosomal *tet(O)* (San Millan, Escudero *et al.* 2009), que han sido también descritos en *Campylobacter* spp, y estreptococos.

1.2.5. Incompatibilidad de los plásmidos tipo ColE1

La incompatibilidad se produce cuando dos plásmidos no son capaces de coexistir establemente en una población bacteriana en crecimiento sin presión selectiva externa (Novick 1987, Phillips y Funnell 2004). Existen dos casos de incompatibilidad:

- i) La incompatibilidad se debe a que los replicones comparten uno o más

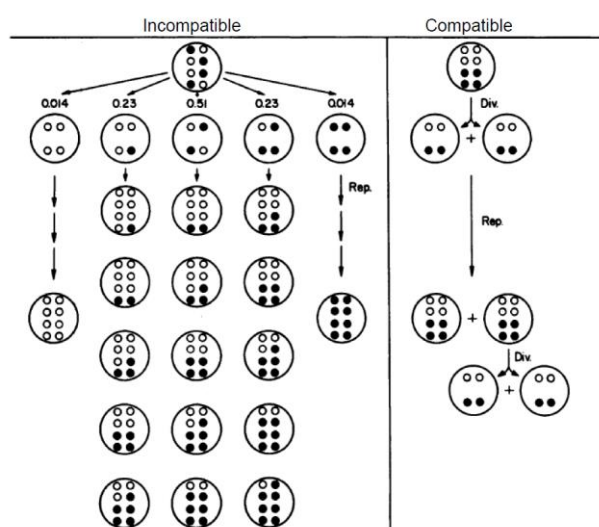


Figura 17. Incompatibilidad segregacional.

Los puntos blancos y negros representan plásmidos con diferente gen reportero que replican en un ciclo 4-8-4. En la parte de la izquierda, dos plásmidos isólogos muestran incompatibilidad. Aparecen mostradas las posibles combinaciones que pueden aparecer estocásticamente (el número indica la probabilidad de que sucedan). En la parte de la derecha, dos plásmidos compatibles. Estos dos patrones representan los modelos hereditarios aplicables a los plásmidos multicopia. Figura modificada de Novick 1987.

elementos implicados en la replicación del plásmido o en sistemas de partición. En este caso, los mecanismos que actúan inhibiendo la replicación plasmídica que habita una célula son capaces de actuar *in trans* en el sistema de replicación del otro plásmido que habite la célula. Este tipo de incompatibilidad se produce en hospedadores que portan plásmidos isólogos –dos o más plásmidos diferenciados por un gen reportero pero con el mismo mecanismo de replicación (Figura 17). El número de copias que muestran los plásmidos inicialmente cuando

cohabitan la célula es la suma del número de copias cuando se encuentran habitando solos la bacteria. En ausencia de selección natural, uno de los dos plásmidos será irremediablemente perdido al azar, ya que el mecanismo de selección no podrá distinguir entre ambos plásmidos. La probabilidad de que un plásmido se pierda durante la replicación dependerá directamente de la proporción individual de plásmidos comparado con el número total de replicones en la célula (Novick y Hoppensteadt 1978, Paulsson 2002, Reyes-Lamothe, Tran *et al.* 2014).

ii) La pérdida de plásmidos es una consecuencia de la variación estocástica del número de copias, mecanismo que se ha sugerido que está también implicado en la inestabilidad de plásmidos (Novick y Hoppensteadt 1978). Si dos tipos de organismos explotan un mismo nicho del mismo modo, la capacidad del ambiente para mantener a ambos organismos dependerá, en gran medida, de las variaciones del número total de organismos que habiten el nicho. Las fluctuaciones en el número de organismos debidas al azar fijarán uno de los organismos al ambiente. Esta analogía se puede aplicar directamente a la incompatibilidad de plásmidos (Paulsson 2002), en la que la incapacidad de medir y corregir fluctuaciones individuales del número de copias –por ejemplo a lo largo del ciclo celular- provoca rápidas pérdidas de plásmidos. La aparición de células sin plásmido cuando dos replicones con diferente mecanismo de replicación habitan células independientes es más lenta de lo que tarde en perderse un plásmido cuando ambos se encuentran cohabitando en la misma bacteria (Novick 1987).

La regulación autónoma del número de copias de un plásmido se llama regulación ipsilateral, mientras que cuando la regulación autónoma –ipsilateral- interfiere con otro replicón, generalmente por homología, se denomina regulación *contralateral*. Existen tres casos de regulación determinada por la restricción contralateral: i) regulación contralateral simétrica, cuando la inhibición mutua y equiparable entre dos plásmidos. En este caso uno de los dos replicones es eliminado estocásticamente ya que la probabilidad de pérdida de plásmido es igual en ambos; ii) regulación contralateral asimétrica o vectorial, en la que la inhibición contralateral es mayor en un plásmido que en el otro, y por tanto se elimina preferentemente el replicón con una regulación más débil; y iii) en el caso en el que los plásmidos son

refractarios a la regulación contralateral del otro replicón, estos plásmidos pertenecen a diferente grupo de incompatibilidad y por tanto pueden coexistir establemente en el hospedador.

No todos los plásmidos de una familia pueden coexistir con miembros de su propia familia debido a la regulación contralateral. Aun así, plásmidos con el mismo origen de replicación pueden cohabitar el mismo hospedador durante 50 generaciones (Velappan, Sblattero *et al.* 2007). En el caso de los plásmidos tipo ColE1: el plásmido ColE1 es compatible con pA15 (Selzer, Som *et al.* 1983) y con CloGL13 (número de acceso a GenBank NC_002119) (van den Elzen, Hakkaart *et al.* 1983), pero no con el plásmido pMB1 (Camps 2010). La regulación ipsilateral de los plásmidos tipo ColE1 está mediada por el ARNI, por tanto en estos plásmidos pequeños, tanto la estabilidad como la incompatibilidad están determinadas por *oriV* (Novick 1987, Summers, Beton *et al.* 1993). Mutaciones en el *oriV* pueden alterar tanto el número de copias como la incompatibilidad plasmídica (Lacatena y Cesareni 1981, Tomizawa y Itoh 1981). Estas mutaciones se encuentran en los SL1, SL2 y SL3 afectando de este modo al *kissing complex* (Figura 18). Las mutaciones generan un desequilibrio entre la regulación ipsi- y contralateral entre dos replicones, ya que no

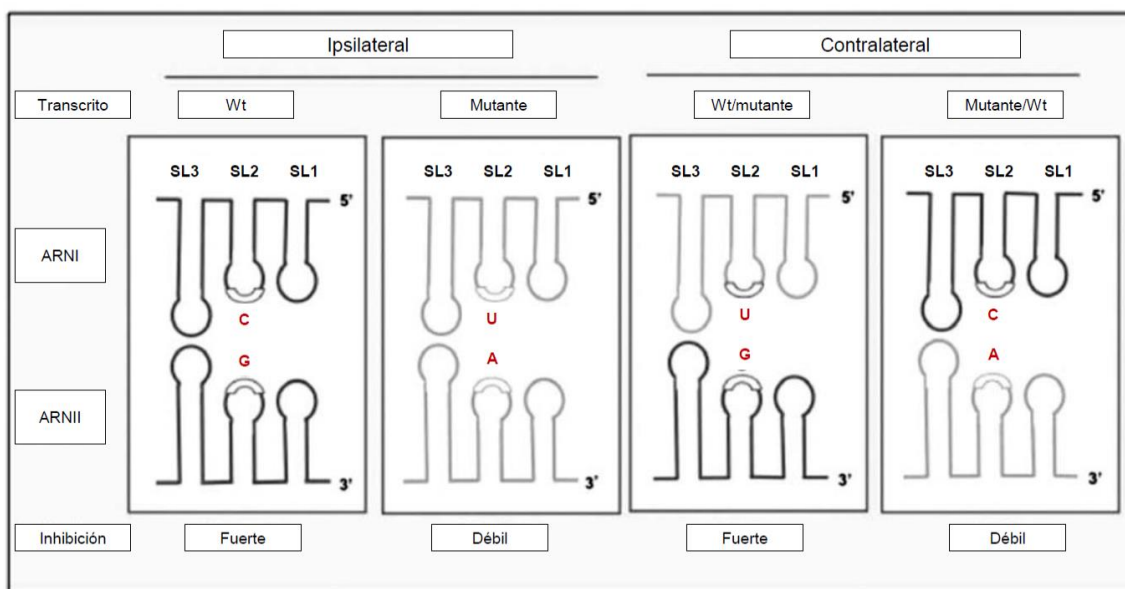


Figura 18. Efectos de mutaciones afectando a los *Steam-Loops* 1, 2 y 3 y su implicación en la regulación contralateral.

Un plásmido tipo ColE1 sufre una mutación G→A en el SL2 del ARNII. Si el plásmido *wild type* (Wt) cohabita con el plásmido mutado, habrá dos moléculas de ARNI inhibidoras en la célula. La inhibición contralateral será la siguiente: El ARNI Wt (C) se enfrenta a una A del ARNII mutado; el ARNI mutado (U) se enfrenta a una G del ARNII Wt. La interacción C/A es más débil que la interacción U/G, y por tanto provocará la eliminación del plásmido con una represión mayor, el plásmido Wt en este caso.

afectan del mismo modo a los dos replicones. También existen mutaciones que estabilizan la conformación del ARNII de tal modo que son insensibles a la regulación ipsilateral llevada a cabo por el ARNI tendiendo por tanto a eliminar al plásmido parental –sin mutaciones en el ARNII- ya que la inhibición del ARNI afecta al plásmido parental pero no al plásmido mutado (Camps 2010).

1.2.6. Cohabitación de plásmidos tipo ColE1 en la naturaleza

En la naturaleza encontramos numerosos ejemplos de cohabitación de plásmidos tipo ColE1 (Tablas 3 y 4). En 2009 describimos por primera vez cómo la multirresistencia en *P. multocida* está mediada por la coexistencia de dos o tres plásmidos tipo ColE1 portando entre uno y dos genes de resistencia (San Millan, Escudero *et al.* 2009) cada uno. En este trabajo, todas las cepas descritas portaban varios plásmidos tipo ColE1 -pB1000/pB1005, pB1000/p9956, pB1000/pB1005/pB1006 y pB1003/pB1002- y como resultado se generaba el fenotipo de multirresistencia -pB1000 porta *bla_{ROB-1}* y confiere alta resistencia a β -lactámicos (Livrelli, Peduzzi *et al.* 1991); pB1002 (número de acceso en GenBank EU283341) es virtualmente igual que pB1000 pero porta *IS_{AplI}* corriente abajo de la β -lactamasa (San Millan, Escudero *et al.* 2009); pB1003 (número de acceso en GenBank EU360945) porta los genes de resistencia a aminoglucósidos *strA* junto con el gen *strB* truncado, con quién habitualmente forma un operón en Pasteurellaceae (Kehrenberg y Schwarz 2001, Kehrenberg y Schwarz 2002) y el gen de resistencia a sulfamidas *sul2*; pB1005 porta, al igual que pB1003, los genes de resistencia *strA* y *sulB* y pB1006 porta el protector ribosomal *tet(O)*, que confiere resistencia a tetraciclinas (Número de acceso a GenBank FJ234438) (Blanco, Kadlec *et al.* 2007). En la tabla 3, encontramos además, todos los ejemplos de cohabitación encontrados en la familia Pasteurellaceae hasta el momento.

Posteriormente se describieron 2 de los 6 plásmidos descritos anteriormente - pB1002 y pB1005, denominados APP7_A y APP7_B en este trabajo- cohabitando con otro plásmido tipo ColE1 –APP7_C- en la cepa AP76 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Los plásmidos del primer artículo (pB1000, pB1005 y pB1006) (San Millan, Escudero *et al.* 2009) tienen una región conservada con una identidad del 84,5% y del 99,4% en nucleótidos respecto al único *oriV* descrito para los

plásmidos tipo ColE1 de la familia Pasteurellaceae (Dixon, Albritton *et al.* 1994). Estas diferencias son suficientes para evitar la incompatibilidad de los plásmidos y, por tanto, poder coexistir establemente en los hospedadores (San Millan, Escudero *et al.* 2009, Camps 2010).

Tabla 3. Plásmidos ColE1 de la familia Pasteurellaceae cohabitando en la naturaleza

Especie	Cepa	Plásmidos tipo ColE1 ^a	Otros ^b	Características ^c
<i>A. pleuropneuminae</i>	AP76	pB1002, pB1003, APP7_C	ND	<i>bla</i> _{ROB-1} ; <i>strA</i> , <i>sul2</i> ; *
<i>H. parasuis</i>	BB1020	pB1000, pB1006	ND	<i>bla</i> _{ROB-1} , <i>tet</i> (O)
<i>P. aerogenes</i>	BB1084	pB1000, pIG1	ND	<i>bla</i> _{ROB-1} , <i>strA</i>
<i>P. multocida</i>	BB1038	pB1000, pB1005	ND	<i>bla</i> _{ROB-1} ; <i>strA</i> , <i>sul2</i>
<i>P. multocida</i>	BB1039	pB1000, p9956	ND	<i>bla</i> _{ROB-1} , <i>tet</i> (H)
<i>P. multocida</i>	BB1046	pB1002, pB1003	ND	<i>bla</i> _{ROB-1} ; <i>strA</i> , <i>sul2</i>
<i>P. multocida</i>	BB1044	pB1000, pB1005, pB1006	ND	<i>bla</i> _{ROB-1} ; <i>strA</i> , <i>sul2</i> ; <i>tet</i> (O)

^a Todos los plásmidos descritos en esta tabla, son aquellos encontrados en la bibliografía y en el laboratorio.

^b Otros plásmidos no ColE1 encontrados en la misma cepa. ND, No Determinados

^c Genes encontrados en la región variable de los plásmidos. * Plásmido críptico

Aunque en Pasteurellaceae no se hayan descrito más plásmidos tipo ColE1 cohabitando -probablemente por la dificultad de identificarlos en los ensayos de secuenciación masiva, al no existir proteínas que puedan asociarse a los replicones y que permitan reconocer la presencia de los plásmidos fácilmente- en la familia Enterobacteriaceae son muchos los casos en los que vemos varios plásmidos cohabitando en una misma célula. En la tabla 4 vemos todos los plásmidos tipo ColE1 encontrados cohabitando en genomas cerrados en GenBank. Por otro lado, en la bibliografía aparecen 6 trabajos describiendo cohabitación entre plásmidos tipo ColE1: la cepa enteropatógena E2348/69 de *E. coli* porta dos plásmidos tipo ColE1 –p6148 y p5217- (Iguchi, Thomson *et al.* 2009). En la cepa 2002017 de *Shigella flexneri* se han encontrado 5 plásmidos coexistiendo, de los cuales 3 son plásmidos tipo ColE1 –pSFxv_3, pSFxv_4 y pSFxv_5- (Ye, Lan *et al.* 2010). 4 plásmidos cohabitan en una bacteria de *S. enterica* serovar Enteritidis –pP, pC, pK y pB- siendo pC y pK dos plásmidos tipo ColE1 (Gregorova, Pravcova *et al.* 2002). Finalmente la coexistencia de plásmidos tipo ColE1 también se ha visto en *Ranella* sp.: WMR114A

y pHW114B son plásmidos tipo ColE1 que cohabitan en la misma bacteria (Rozhon, Petutschnig *et al.* 2010). Mediante la metodología PLACNET (*plasmid constellation networks*) que permite la reconstrucción de los plásmidos de cualquier genoma (Lanza, de Toro *et al.* 2014) se recuperaron en la cepa E61BA del clon patológico ExPEC ST131 de *E. coli*, cohabitando con otros 5 plásmidos no ColE1, los plásmidos pE61BA-5 y pE61BA-6 de 6,6 y 6,9 kb respectivamente. Finalmente, el caso más sorprendente de la cohabitación de plásmidos tipo ColE1 es el descrito en el trabajo de Stoesser y colaboradores (Stoesser, Sheppard *et al.* 2016). En él se analizan 215 aislados del clon de *E. coli* ST131 para conocer su trayectoria evolutiva. A la hora de recuperar plásmidos tipo ColE1 de los genomas, utilizan dos secuencias como referencia: DQ298019 y DQ995353, correspondientes a los plásmidos tipo ColE1 pIGMS32 y pMG828-3 respectivamente. En total, 21 de los 215 clones estudiados muestran al menos una lectura que solapa con cada uno de los dos plásmidos de referencia, indicando la presencia de al menos dos plásmidos tipo ColE1 en cada uno de los clones.

Tabla 4. Plásmidos ColE1 de la familia Enterobacteriaceae cohabitando en la naturaleza

Especie	Cepa	Plásmidos tipo ColE1 ^a	Otros ^b	Características ^c
<i>Citrobacter. freundii</i>	CAV1741	pCAV1741-1960, pCAV1741-3233	4	HP ¹ , HP
<i>C. freundii</i>	CAV1321	pCAV1321-1916, pCAV1321-3233, pCAV1321-3820, pCAV1321-4310, pCAV1321-4938	4	HP, HP, HP, HP, HP
<i>Enterobacter cloacae</i>	34978	P34978-4.398, p34978-5.413, p34978-2.725	3	HP, HP, HP, HP
<i>Escherichia coli</i>	O26:H11	pO26_4, pO26_3	2	HP, R/M ²
<i>E. coli</i>	SMS-3-5	pSMS35-8, pSMS35_3	2	Col-E10 ³ , IS1
<i>E. coli</i>	O55:H7	p12579_5, p12579_4, p12579_3	2	M; Aph(3'')-ib, Aph(6)-Id; TEM-1
<i>E. coli</i>	E24377A	pETEC_6, pETEC_5	4	Aph(6)-Id, Aph(3'')-Ib, <i>sul2</i> ; <i>nga</i>
<i>E. coli</i>	SE11	pSE11-5, pSE11-4	4	HP, <i>nga</i>
<i>E. coli</i>	PCN061	PCN061p3, PCN061p2, PCN061p1	3	<i>sul2</i> , Aph(3'')-Ib, Aph(6)-Id; HP; HP

<i>E. coli</i>	ST648	pEC648_7, pEC648_5	4	HP, HP.
<i>Klebsiella oxytoca</i>	CAV1374	pCAV1374-6538, pCAV1374-14	9	Tn3, Tn3
<i>K. pneumoniae</i>	234-12	pKpn2312-5, pKpn23412-4	0	HP, HP
<i>K. pneumoniae</i>	MGH 78578	pKPN6, pKPN7	3	HP, HP
<i>K. pneumoniae</i>	Kp13	pKP13b, pKP13c	4	SMR ⁴
Salmonella Typhimurium	CFSAN001921	unnamed 2 (NC_021843), unnamed3 (NC_021816)	1	HP, HP
<i>S. enterica</i>	YU39	pYU39_4.8, pYU39_4.2	4	HP, HP
<i>Serratia marcescens</i>	CAV1492	pCAV1492-3223, pCAV1492-6393	4	ND
<i>Shigella flexneri</i>	2002017	pSFxv_3, pSFxv_4, pSFxv_5	2	<i>strA</i> , HP, Fe ⁵
<i>S. sonnei</i>	Ss046	pSS046_spA, pSS046_spB	2	<i>tet(A)</i> , Col-E1 ³

^a Todos los plásmidos descritos en esta tabla, son aquellos encontrados en GenBank depositados en cromosomas cerrados.

^b Otros plásmidos no ColE1 presentes en la célula.

^c Genes encontrados en la región variable de los plásmidos tipo ColE1. ¹ HP, Proteína hipotética; ² M/R, sistema de restricción/modificación; ³ Col-E1, Colicina E1; ⁴ SMR, *Small Multidrug Resistance proteins*; ⁵ Fe, implicado en la resistencia al hierro.

Resulta interesante cómo al menos dos de los plásmidos descritos cohabitando con otros plásmidos tipo ColE1 –p6148 y pSFxv_3- portan determinantes de resistencia. Más relevante son las cepas O55:H7 y E24377A, que igual que las cepas descritas en la Tabla 3, generan fenotipo de multirresistencia mediante la cohabitación de plásmidos tipo ColE1.

1.2.7. Estabilidad de los plásmidos tipo ColE1

Para asegurar la estabilidad de los replicones, durante la replicación celular cada célula hija tiene que recibir al menos un plásmido. En 1988 se propuso que la estabilidad de los plásmidos se ve determinada por cinco factores (Ayala-Sanmartin y Gomez-Eichelmann 1989):

- i) Sistema preciso de regulación del número de copias.

Como ya hemos visto, los plásmidos tipo ColE1 tienen un sistema preciso de regulación de su número de copias que determina el número de copias por célula de los replicones tipo ColE1 (Camps 2010, Brantl 2014, Lilly y Camps 2015).

Para coexistir establemente con el hospedador y minimizar el coste biológico, los plásmidos controlan negativamente su número de copias, corrigiendo fluctuaciones en cada célula individual, de tal modo que el número de copias de un plásmido normalmente es estable en un determinado hospedador bajo condiciones de crecimiento concretas (del Solar y Espinosa 2000). La estabilidad de los plásmidos puede verse incrementada o aumentando el número de copias o mejorando el control de la replicación y por tanto reduciendo la variación del número de copias (Paulsson y Ehrenberg 1998). La fluctuación del número de copias de un plásmido en

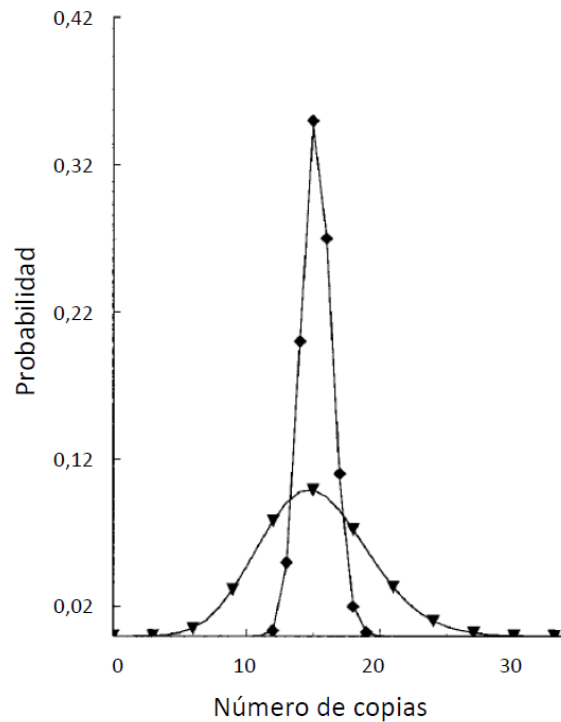


Figura 19. Número de copias totales de un plásmido al final del ciclo celular.

Tanto el plásmido representado por un rombo como el plásmido representado por un triángulo tienen un número medio de copias al final del ciclo celular de 16 copias. Sin embargo, dado que existe menor variabilidad en el número de copias del plásmido representado por un rombo, la probabilidad de que aparezcan bacterias sin replicones es menor. Figura modificada de Paulsson 1998.

condiciones óptimas de crecimiento entre las bacterias individuales dentro de una población sigue una distribución Gaussiana. Por tanto, la probabilidad de que un plásmido se pierda en tras la duplicación celular, será mayor cuanto menor sea su capacidad de controlar la desviación del número de copias de plásmido al final de la replicación celular (Figura 19). De tal modo si un plásmido con determinadas copias tiene desviación baja, la probabilidad de

que aparezca un segregante sin plásmido será menor que si el mismo plásmido con las mismas copias presenta una gran desviación.

- ii) *Sitio activo de partición mediado por la unión de un sistema celular a una región específica del ADN plasmídico.*

Existen diferentes sistemas de partición que se encargan de que la mitad de las copias de un plásmido sean heredadas por cada célula hija en la duplicación celular (Thomas 2000, Guynet y de la Cruz 2011). Estos sistemas de partición están asociados a los plásmidos de bajo número de copias. Sin embargo, a diferencia de los plásmidos de bajo número de copias, los plásmidos multicopia como son los tipo ColE1 carecen de un sistema de partición activo. Aunque se ha publicado en numerosas ocasiones que los plásmidos tipo ColE1 se localizan en regiones citoplasmáticas diferentes del volumen cromosómico –nucleoide-, situándose preferentemente en los polos celulares (Pogliano, Ho *et al.* 2001, Reyes-Lamothe, Tran *et al.* 2014), recientemente se ha demostrado que los plásmidos tipo ColE1 se distribuyen completamente al azar por el citoplasma, en ocasiones formando agrupaciones. No obstante, aunque la distribución plasmídica tiende a localizarse en la periferia celular, sí que se encuentran plásmidos ocupando el nucleoide (Wang, Penkul *et al.* 2016). Por tanto, la probabilidad de aparición de una célula libre de plásmidos dependerá directamente del número de copias que presente el replicón en la bacteria siguiendo la fórmula $p_0=2^{(1-n)}$, siendo n el número de copias de plásmidos en una célula (Ayala-Sanmartin y Gomez-Eichelmann 1989, Summers, Beton *et al.* 1993). Así, cuando un plásmido tipo ColE1 presente más de 15 copias en una célula, la probabilidad de aparición de una célula sin plásmidos es tan baja ($\approx 6,10 \times 10^{-5}$) que las bacterias pueden mantener los plásmidos tipo ColE1 durante 100-200 generaciones sin un mecanismo de partición activo.

- iii) *Sitio específico para resolver la recombinación de los multímeros que se pueden producir como consecuencia de eventos recombinativos.*

Como ya hemos visto, la estabilidad de los replicones depende directamente del número de copias. Sin embargo, la aparición de dímeros de plásmidos por recombinación afecta directamente a la estabilidad de los replicones –fenómeno conocido como la catástrofe de los dímeros- (Summers, Beton *et al.* 1993). Los dímeros de plásmidos se forman a baja frecuencia mediante recombinación homóloga entre monómeros, pero incluso una frecuencia relativa de dímeros tiene un gran efecto negativo en la estabilidad del plásmido. Cuando se forma un dímero se producen dos efectos que influyen directamente en la estabilidad: a) disminuye el número de copias de la población –si todos los plásmidos forman dímeros el número de copias se reduce a la mitad-, aumentando exponencialmente la probabilidad de aparición de células libres de plásmidos (en el ejemplo de un plásmido con 15 copias en la célula, si se formasen dímeros la probabilidad de aparición de segregantes libres de plásmidos aumentaría de $6,10 \times 10^{-5}$ a 0,01) y b) la velocidad de replicación de los formando dímeros se duplicaría al presentar doble origen de replicación, por tanto se acumularían frente a los monómeros. El plásmido ColE1 presenta un sistema de recombinación específico Xer/*cer* para resolver los dímeros (Summers y Sherratt 1988). Las proteínas cromosómicas XerC y XerD, ayudadas por las proteínas accesorias ArgR y PepA, reconocen una región plasmídica de 250 pb, y, actuando en *trans*, resuelven los dímeros (Stirling, Szatmari *et al.* 1988, Stirling, Colloms *et al.* 1989, Guhathakurta, Viney *et al.* 1996, Werbowy, Boratynski *et al.* 2015).

- iv) *Sistemas de muerte post-segregación para la bacteria que impide la aparición de células libres de plásmidos.*

Existen dos sistemas implicados en la muerte post-segregación de células libres de plásmidos: sistemas toxina/antitoxina y sistemas de restricción-modificación de ADN (Gerdes, Rasmussen *et al.* 1986, Kulakauskas, Lubys *et al.* 1995). La muerte post-segregacional mediante la presencia en el replicón de sistemas toxina/antitoxina produce por la

eliminación de las células sin replicón como consecuencia del efecto producido por la toxina en la célula. Las toxinas, que inhiben la proliferación celular o su viabilidad, son neutralizadas por las antitoxinas. Las toxinas son siempre proteínas y son siempre más estables que las antitoxinas que pueden ser proteínas o ARN. En células portando el sistema toxina/antitoxina codificado en plásmidos, ambos genes se expresan, y por tanto la antitoxina anula el efecto de la toxina. En células sin el sistema toxina/antitoxina, puesto que la antitoxina se degrada antes, la toxina provocará la muerte celular impidiendo el crecimiento de las células sin plásmido (Hernandez-Arriaga, Chan *et al.* 2014). En los plásmidos tipo ColE1, un buen ejemplo es el plásmido ColE1 porta toxina colicina E1, una bacteriocina de la cual toma su nombre, y a su vez porta la proteína *imm* que codifica inmunidad para la colicina (Sabik, Suit *et al.* 1983).

La muerte post-segregacional debida al sistema de restricción-modificación del ADN se basa en el mismo principio que el de sistema toxina/antitoxina. Los plásmidos portan una metiltransferasa que metila el ADN del hospedador y previene su digestión por la enzima endonucleasa -que es más estable que la metiltransferasa- portada por el mismo plásmido. La ausencia de la metilasa debida a la pérdida del replicón permite la digestión del cromosoma no metilado. También existen distintos ejemplos de plásmidos tipo ColE1 portando un sistema de modificación-restricción (Naito, Naito *et al.* 1998, Cooper y Heinemann 2000, Werbowy, Boratynski *et al.* 2015). La ausencia del sistema de restricción-modificación de ADN del plásmido tipo ColE1 pEC156 disminuye la estabilidad del replicón significativamente (Werbowy, Boratynski *et al.* 2015).

- v) *Inhibición temporal de la división celular.*

Como hemos visto anteriormente, la resolución de dímeros es un punto clave en la estabilidad de los plásmidos tipo ColE1. Pero para asegurar la estabilidad, no solamente deben ser resueltos los dímeros, sino que es completamente necesario que se produzca antes de la duplicación celular. (Patient y Summers 1993). El plásmido ColE1 codifica un ARN regulador,

denominado Rcd, que parece que coordina la resolución de los dímeros y la división celular. Rcd se transcribe desde el promotor P_{cer} , que se encuentra dentro del sitio de resolución de dímeros Cer. La unión de la recombinasa XerCD silencia la expresión de *rcd*. P_{cer} está sobreexpresado en las células que portan dímeros (Gaimster y Summers 2015) y aunque no se sabe a ciencia cierta por qué se produce mayor expresión de *rcd* en los dímeros que en los monómeros, se especula si este fenómeno tiene que ver con la mayor proximidad entre los sitios *cer* en los dímeros en comparación con los monómeros, o con la incapacidad de las proteínas XerCD de unirse a ambos *cer* de un dímero (Blaby y Summers 2009). Una vez expresado, Rcd se une a la proteína triptofanasa. Esta enzima convierte el triptófano en indol, piruvato y amonio. Cuando la triptofanasa está unida a Rcd, tiene mayor afinidad por el triptófano, y por tanto, se produce una mayor concentración de indol en la bacteria (Gaimster y Summers 2015). Finalmente, el indol inhibe la división celular actuando como un ionóforo que reduce el gradiente de protones a lo largo de la membrana citoplasmática, que, tras impedir la correcta localización de FtsZ, inhibe la formación del septo divisorio (Chimerel, Field *et al.* 2012). De esta manera, hasta que los dímeros no se han resuelto, se inhibe la replicación facilitando la resolución de los dímeros.

Mantener un número de copias alto parece suficiente para asegurar que ambas células hijas recibirán al menos un plásmido durante la división celular. Sin embargo, debido al coste metabólico asociado a los replicones, el número de copias no puede ser demasiado alto (Gaimster y Summers 2015). Así, se ha demostrado que los plásmidos tipo ColE1 restringen el crecimiento de las bacterias que los portan comparado con las mismas bacterias sin plásmidos de manera que mediante competiciones directas entre poblaciones portadoras y no portadoras de replicones se ha demostrado que el coste biológico de los plásmidos tipo ColE1 es muy elevado, similar al coste biológico de los plásmidos conjugativos (San Millan, Garcia-Cobos *et al.* 2010, Moleres, Santos-López *et al.* 2015). Por tanto parece que su efecto en el *fitness* bacteriano no depende del tamaño del replicón y que probablemente su coste biológico sea consecuencia del secuestro de substratos como nucleótidos, aminoácidos, componentes catalíticos como pueden ser las ADN y ARN polimerasas o los ARNts, y los requerimientos energéticos derivados de la presencia del replicón

[ver revisión (Diaz Ricci y Hernandez 2000)]. Sin embargo, no existen trabajos que determinen exactamente el motivo del coste biológico de estos replicones. Por ejemplo, Rozkov y colaboradores encontraron un aumento en el ciclo de Krebs y en la respiración en las cepas portando plásmidos (Rozkov, Avignone-Rossa *et al.* 2004), aunque estos efectos parecen asociados al determinante de resistencia que portan los plásmidos y no a los plásmidos en sí. Del mismo modo Wang y colaboradores (Wang, Xiang *et al.* 2006) encontraron que un plásmido tipo ColE1 portando una β -lactamasa en *E. coli* tiene impacto en el ciclo de Krebs, en el ratio de respiración, en el metabolismo de las pentosas y en la producción de acetato. Cuando compararon el perfil transcriptómico de la cepa portando el mismo plásmido tipo ColE1 con alto y bajo número de copias vieron que el plásmido con alto número de copias producía un aumento de la expresión de RpiA, enzima implicada en el metabolismo de las pentosas. Sin embargo, no se puede determinar si la alteración de las vías metabólicas vistas en este trabajo se debe a la presencia del replicón o al determinante de resistencia.

Para entender la prevalencia de los plásmidos tipo ColE1 en la naturaleza, consideramos necesarios más estudios para determinar el impacto de los plásmidos en las células bacterianas, así como los posibles mecanismos evolutivos que pueden compensar el coste biológico de los mismos. También acusamos una considerable ausencia de estudios sobre el efecto en el *fitness* de los plásmidos tipo ColE1 cuando cohabitan en la naturaleza.

Objetivos y justificación

2. Objetivos y justificación

La crisis sanitaria provocada por las resistencias a antibióticos es uno de los problemas de salud pública más importantes a los que nos enfrentamos en la actualidad. El desarrollo de las resistencias en ambientes naturales u hospitalarios y su posterior diseminación mediante eventos de transferencia horizontal de genes son elementos clave que agravan este problema sanitario.

Numerosos trabajos demuestran la importancia de la diseminación de resistencias a antibióticos mediada por plásmidos. Aproximadamente el 15% de los plásmidos descritos en las bases de datos son plásmidos tipo ColE1, y su implicación en la adquisición, la diseminación y la expresión de determinantes de resistencia, que supone un problema asociado a patógenos animales y humanos, ha sido ampliamente descrita en la bibliografía. Una característica clínicamente relevante de los plásmidos ColE1 es su gran capacidad de generar multirresistencia mediante la cohabitación de varios replicones en la misma bacteria.

Se han caracterizado detalladamente los mecanismos moleculares implicados en la estabilidad y la movilización de los plásmidos tipo ColE1. Sin embargo, no se ha estudiado en profundidad el éxito evolutivo de estos replicones –entendido como la alta prevalencia de estos replicones en las poblaciones bacterianas-. La adquisición de plásmidos tipo ColE1 por parte de una bacteria supone una disminución en el crecimiento del hospedador debida al coste biológico asociado al replicón. Sin embargo, en determinados ambientes la presencia del plásmido le otorga una ventaja a la bacteria portadora. El equilibrio entre el coste biológico asociado al plásmido y el beneficio que el mismo le otorga a la bacteria en determinados ambientes será determinante para entender la persistencia de los plásmidos tipo ColE1 en las poblaciones bacterianas.

Por ello, el objetivo principal de esta tesis doctoral será entender el éxito de la prevalencia de los plásmidos ColE1 en la naturaleza. En concreto, estudiaremos la adaptación de un plásmido ColE1 a su hospedador natural en presencia y ausencia de antibióticos. Específicamente, centraremos nuestra atención en la evolución del coste biológico de un plásmido tipo ColE1 en ausencia de antibióticos y cómo la presencia

de los antibióticos influye tanto en el éxito del replicón como en la resistencia antimicrobiana.

El estudio del coste biológico de un plásmido tipo ColE1 nos permitirá adentrarnos en la cohabitación plasmídica: la coexistencia de varios replicones en un mismo hospedador en ausencia de presión selectiva no se selecciona debido al coste biológico impuesto por cada uno de los replicones. Por tanto, el segundo objetivo específico de esta tesis doctoral será intentar comprender cómo es posible la cohabitación de plásmidos tipo ColE1 en ausencia de presión selectiva.

Materiales y Métodos

3. Materiales y métodos

En esta tesis hemos trabajado con un modelo bacteriano compuesto por uno o varios plásmidos tipo ColE1 (pB1000, pB1005 o pB1006) y el hospedador dónde han sido ampliamente descritos *H. influenzae*. En concreto, hemos utilizado la cepa Rd KW20.

Mediante evoluciones experimentales cortas (entre 200 y 300 generaciones) hemos sometido a nuestro modelo a diferentes ambientes como por ejemplo tratamientos antimicrobianos, para analizar la coevolución plásmido(s)/hospedador.

Para conocer cómo se comportan los plásmidos dentro del hospedador, es necesario conocer cómo evoluciona el número de copias del replicón a lo largo del tiempo. En los tres trabajos que componen esta tesis doctoral, hemos analizado el número de copias de los replicones mediante PCR cuantitativa, utilizando como gen de referencia el gen monocopia *rpoB*.

Otro aspecto necesario para determinar el comportamiento de los replicones es conocer su coste biológico. Para determinarlo, hemos realizado ensayos de competición directa (mostrados en la Figura 5) entre cepas isogénicas portadoras de plásmidos frente a la misma cepa carente del plásmido.

Para obtener nuestros resultados, también hemos analizado el fenotipo de resistencia conferido por los plásmidos en los diferentes ambientes. Hemos tomado como referencia las guías del *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) para determinar el nivel de resistencia a determinados antibióticos mediante microdilución en placa.

En esta tesis doctoral, también nos hemos basado en técnicas novedosas para obtener los resultados. Hemos secuenciado masivamente el genoma de 10 poblaciones bacterianas.

Finalmente hemos dado mayor relevancia a nuestros datos mediante análisis *in silico* y modelos matemáticos o análisis estadísticos.

Todas las técnicas están ampliamente descritas en el apartado de “Resultados”

Resultados

4. Resultados

Esta tesis doctoral se presenta en formato de resultados. No obstante el primer trabajo ha sido publicado en la revista “*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*” (Factor de impacto en 2014*: 4,476), el segundo trabajo está aceptado pendiente de cambios en la misma revista, y el tercer trabajo está preparado para enviar a revista de impacto para su publicación.

4.1. La Resistencia a Antibióticos Mediada por Plásmidos Pequeños Aumenta Mediante el Incremento en el Número de Copias de Plásmidos y el *Fitness* Bacteriano.

4.1.1. Resumen

Los plásmidos juegan un papel importante en la diseminación de determinantes de resistencia entre patógenos bacterianos mediante la transferencia horizontal. Cuando un plásmido que porta un determinante de resistencia llega a un nuevo hospedador, produce un coste biológico, causando en ausencia de presión antibiótica una desventaja competitiva para la bacteria que porta el plásmido. Por otro lado, en presencia de antibióticos, los plásmidos promueven la resistencia del clon. Las adaptaciones experimentadas por el plásmido y la bacteria en presencia de antibióticos durante las primeras generaciones serán cruciales para el progreso de la infección y del mantenimiento de la resistencia mediada por el plásmido una vez que acabe el tratamiento bacteriano. En este trabajo hemos desarrollado un modelo utilizando el patógeno humano *Haemophilus influenzae* portando el pequeño plásmido pB1000, que confiere resistencia a antibióticos β -lactámicos, para investigar las adaptaciones del plásmido y del hospedador durante un tratamiento con ampicilina simulado. Nuestros resultados prueban que los clones portando los plásmidos compensan el coste biológico del replicón en las 100 primeras generaciones de adaptación plásmido/bacteria. Además, el tratamiento con ampicilina provoca un aumento del número de copias de pB1000. El aumento de las mejoras del crecimiento, y del número de copias del plásmido, provoca que las bacterias se hagan más resistentes a ampicilina. En conclusión, mostramos como la modulación en el crecimiento bacteriano y el número de copias del plásmido ayudan a la bacteria portando el plásmido a adaptarse durante un tratamiento antibiótico, promoviendo la supervivencia de la bacteria y la diseminación de la resistencia.

4.1.2. Introducción

La resistencia a antibióticos en bacterias patógenas es actualmente uno de los problemas más preocupantes en la sanidad. Las bacterias resistentes producen infecciones que son difíciles de curar, incrementando los ratios de mortalidad y los costes económicos asociados (Gonzalez Zorn y Escudero 2012, CDC 2013). Los plásmidos pueden diseminar determinantes de resistencia a través de THG, teniendo un papel crucial en la adquisición de resistencias en las bacterias patógenas (Gogarten y Townsend 2005, Nikaido 2009). Portar plásmidos, sin embargo, supone un coste biológico para el hospedador bacteriano, (Vogwill y MacLean 2015), determinando una selección negativa para los clones que portan los plásmidos en ausencia de antibióticos. Estudios previos han analizado como la bacteria compensa el coste producido por los plásmidos durante periodos largos de coevolución (Bouma y Lenski 1988, Harrison y Brockhurst 2012). Sin embargo, existe menos información sobre las adaptaciones experimentadas por los plásmidos durante periodos cortos de tiempo (San Millan, Peña-Miller *et al.* 2014). Los tratamientos antibióticos seleccionan los clones portando los plásmidos de resistencia, y les otorgan la oportunidad de evolucionar durante un periodo corto de tiempo en un ambiente libre de competidores, dado que el antibiótico mata a las poblaciones sensibles. Las adaptaciones tanto en el nivel de resistencia y el coste biológico producido por el replicón, determinaran el éxito de las bacterias portando a los plásmidos durante y después del tratamiento antibiótico.

En este trabajo, publicado en la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (San Millan, Santos-Lopez *et al.* 2015), investigamos las adaptaciones a corto plazo de un plásmido que porta resistencia a antibióticos, utilizando *H. influenzae*, un importante patógeno humano que produce otitis, neumonía y meningitis (Tristram, Jacobs *et al.* 2007). Hemos desarrollado un modelo utilizando la cepa *H. influenzae* Rd KW20 (Rd), transformada con el plásmido pequeño pB1000 (Rd/pB1000), para analizar las modificaciones sufridas por el hospedador y el plásmido pequeño en presencia de antibióticos. pB1000 es un plásmido pequeño tipo ColE1, que porta la β -lactamasa *bla*_{ROB-1}, gen que confiere resistencia a aminopenicilinas (Figuras 12, 13, 15 y 16) (Cao, Lambert *et al.* 2002, Lancashire, Terry *et al.* 2005, Kehrenberg, Hopkins *et al.* 2007, San Millan,

Escudero *et al.* 2007, San Millan, Escudero *et al.* 2009, Zioga, Whichard *et al.* 2009, Chen, Lindsey *et al.* 2010, Pallecchi, Riccobono *et al.* 2010, San Millan, Garcia-Cobos *et al.* 2010, Tristram, Littlejohn *et al.* 2010, de Toro, Rodríguez *et al.* 2013). Atendiendo a las relaxasas, los plásmidos movilizables tipo ColE1 pertenecen a la familia MOBP₅ (Figura 15) (Alvarado, Garcillan-Barcia *et al.* 2012) y tienen gran importancia como portadores de genes de resistencia en las familias Pasteurellaceae y Enterobacteriaceae (Figuras 11 y 12). pB1000 ha sido descrito en una gran variedad de miembros de la familia Pasteurellaceae, incluyendo patógenos animales como *P. multocida*, y *H. parasuis*, así como en aislados clínicos del patógeno humano *H. influenzae* en España, Italia, Estados Unidos y Australia (San Millan, Escudero *et al.* 2007, San Millan, Escudero *et al.* 2009, San Millan, Garcia-Cobos *et al.* 2010, Tristram, Littlejohn *et al.* 2010, San Millan, Giufre *et al.* 2011).

En este trabajo, mediante evolución experimental, simulamos un tratamiento antibiótico e investigamos las adaptaciones que se producen en el plásmido y en la bacteria en el modelo Rd/pB1000. Específicamente medimos, i) la evolución del *fitness* bacteriano, ii) los efectos del antibiótico en el número de copias de los plásmidos (NCP), y iii) las fluctuaciones en el nivel de resistencia sobre el tiempo. Además demostramos como las modificaciones en el *fitness* de la bacteria y el NCP contribuyen al aumento del fenotipo de resistencia de Rd/pB1000.

4.1.3. Materiales y Métodos

Cepas bacterianas, condiciones de cultivo, y determinación de la resistencia a antibióticos.

Transformamos *H. influenzae* Rd mediante electroporación con pB1000 obtenido de *P. multocida* BB1038 (San Millan, Escudero *et al.* 2009) tal y como se describió previamente (San Millán, Garcia-Cobos *et al.* 2010) utilizando el aparato Gene Pulser (Bio-Rad, EEUU). Rd y Rd/pB1000 fueron cultivadas en agar chocolate PolyViteX (bioMérieux, Francia), y en medio *Haemophilus Test Medium* (HTM) (Francisco Soria Melguizo, S.A., España) a 125 revoluciones por minuto, 37° C y en condiciones microaerofílicas (5% CO₂). Detallamos las poblaciones analizadas durante la evolución experimental en la Tabla 5. Determinamos la estabilidad del plásmido

pB1000 en *H. influenzae* Rd, propagando cinco poblaciones de Rd/pB1000 en HTM durante 200 generaciones, plaqueando diluciones seriadas de los cultivos finales, y replicando un total de 100 colonias en placas de agar chocolate conteniendo 100 mg/L de ampicilina. Confirmamos la presencia de pB1000 mediante PCR en un total de esas 20 colonias (San Millan, Garcia-Cobos *et al.* 2010). Determinamos las CMI a los antibióticos testados en HTM utilizando el método de microdilución siguiendo las instrucciones del CLSI (CLSI 2007). Para determinar el nivel de resistencia de las cepas parentales Rd y Rd7pB1000, utilizamos los controles utilizamos *H. influenzae* ATCC 49247, y ATCC 48766. En las siguientes estimaciones de la CMI, utilizamos concentraciones crecientes en dos diluciones de ampicilina desde 0,125 a 256 mg/L, y posteriormente incrementamos la concentración en 256 mg/L en cada dilución hasta alcanzar la concentración 4096 m/L. Los antibióticos fueron obtenidos de Sigma (Sigma-Aldrich, Reino Unido).

Tabla 5. Poblaciones utilizadas en este estudio

Poblaciones ^a	Poblaciones evolucionadas de	Días ^b	Presencia de ampicilina
Rd-10	Rd	10	No
Rd/pB1000-10	Rd/pB1000	10	No
Rd/pB1000A-10	Rd/pB1000	10	Sí
Rd-20	Rd-10	10(20)	No
Rd/pB1000-20	Rd/pB1000-10	10(20)	No
Rd/pB1000A-20	Rd/pB1000A-10	10(20)	No
Rd-20/pB1000	Rd-20 (transforemd with pB1000)	NA ^c	NA

^a Hay cinco replicas por población

^b Los números en paréntesis representan los días acumulados de evolución desde la cepa parental original Rd o Rd/pB1000

^cNA, No applicable.

Estimación del *Fitness* bacteriano

Calculamos el coste biológico de pB1000 mediante experimentos de competición directa (Figura 5) entre *H. influenzae* Rd y *H. influenzae* Rd/pb1000 en HTM en tres experimentos independientes. Las cepas crecieron durante 16 h a 37°C y 5% de CO₂, y después mezclamos 10⁶ Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *H. influenzae* Rd con 10⁶ UFC de *H. influenzae* Rd/pB1000 en 2 ml de HTM. La mezcla fue crecida a 37°C, 5% CO₂, y 125 revoluciones por minuto durante 24 horas. Cada

24 h durante 6 días, transferimos 10^6 UFC a 2 ml de HTM fresco en una dilución 1/1000. Tomamos muestras en el tiempo cero (momento en el que se mezclan las dos poblaciones) y cada 24 horas durante 100 días. Por cada muestra, plaquemos alícuotas en agar chocolate no selectivo, y calculamos la proporción de bacterias resistentes mediante plaqueo de 50 a 100 colonias en agar chocolate conteniendo 100 mg/L de ampicilina). Calculamos el índice de competición (IC) cada día como el ratio entre las UFCs de las bacterias resistentes y sensibles en el t_1 dividido por el mismo ratio en el t_0 (Bjorkman y Andersson 2000). Estimamos el coeficiente de selección, s , como la recta de la regresión lineal del modelo $\ln(IC)/t$, donde el tiempo (t) fue medido en generaciones bacterianas, calculadas como el \log_2 del factor de dilución (Lenski 1991). El *fitness* relativo (w), fue calculado con la siguiente fórmula: $w = 1 + s$. Realizamos los experimentos de competición en triplicado, y el coeficiente de selección por generación fue calculado como la media de los tres experimentos independientes. Para la determinación del *fitness* de las bacterias evolucionadas, competimos las líneas Rd/pB1000 contra la cepa Rd parental, y la cepa Rd parental y sus líneas propagadas contra Rd/pB1000 utilizando las mismas condiciones descritas encima. Los *fitness* de cada línea evolucionada fueron estimados relativos a la cepa parental Rd.

Determinación del número de copias

Determinamos el NCP esencialmente como está descrito por San Millan *et al.* (San Millan, Heilbron *et al.* 2014). Las PCRs cuantitativas (qPCR) fueron realizadas utilizando el My iQ single-color real-time PCR detection system (Bio-Rad, EEUU). Calculamos el NCP del pB1000 original en la cepa Rd mediante tres mediciones independientes de tres extracciones de ADN, con tres réplicas técnicas. También extrajimos el ADN de cada una de las poblaciones propagadas y mediante qPCR (realizadas en triplicado en cada extracción) determinamos el NCP medio por cada célula. Relazamos las extracciones de ADN a partir de 2 ml HTM de cultivos a una densidad óptica (DO) a 600 nm aproximada de 0.9, utilizando el QIAamp DNA minikit (Qiagen, EEUU). Cuantificamos la cantidad de ADN utilizando un Eppendorf BioPhotometer (Eppendorf, Alemania). Dado que el ADN lineal es mejor molde para la realización de las qPCRs que el ADN no digerido (Providenti, O'Brien *et al.* 2006), linearizamos los plásmidos mediante digestión: 1 μ g de ADN de cada extracción fue

digerido utilizando 20 unidades de *PstI* (TaKaRa, Japón) durante 2h a 37°C. Después, inactivamos *PstI* durante 15 minutos a 60°C. No encontramos dianas de *PstI* en los productos amplificados. Para la realización de las qPCRs, desarrollamos reacciones específicas para amplificar pB1000 (oligo *foward*, CCAATTCTGTTCATTCGGTAAC; oligo *reverse*, CATAAGCAAAGCGTTCATCTG; tamaño del amplicón 195 pb; eficiencia 98,2%; r^2 0,999) y el gen monocopia cromosomal *rpoB* (oligo *foward*: GCAGACGAAGCGGAAATC, oligo *reverse* AAGGCTATAAGAACCTGTTGAAC; tamaño del amplicón 192; eficiencia 98,7%; r^2 ; 0,999), para comparar el ratio del ADN cromosómico frente al plasmídico. Calculamos las eficiencias realizando diluciones seriadas de ADN con un factor de dilución 1/8, por tanto, trabajando en un rango de concentración de ADN de 0,2 ng/L a 50 fg/L). Realizamos las qPCRs utilizando el Bio-Rad iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, EEUU) a una concentración final de 10 pg/L. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial durante 10 minuto a 94°C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización durante 1 minuto a 94°C, anillamiento durante 1 minuto a 58,7°C (*bla_{ROB-1}*) o 52°C (*rpoB*), y extensión durante 1 minuto a 72°C. En todas las qPCRs pusimos muestras para normalizar los resultados. Para calcular el NCP por cromosoma utilizamos la fórmula (San Millan, Heilbron *et al.* 2014) $NCP = [(1 Ec)CTc / (1 Ep)CTp] * (Sc/Sp)$, donde Sc y Sp son los tamaños de los amplicones del cromosoma y del plásmido respectivamente (en pb), Ec y Ep son las eficiencias de las qPCRs del cromosoma y del plásmido (relativas a 1) y CTc y CTp son los ciclos *threshold* de las reacciones cromosómicas y plasmídicas respectivamente.

Secuenciación masiva

Realizamos secuenciación masiva del ADN total de las poblaciones utilizando SOLiD v4 (Life Techonoliges, EEUU). Generamos las librerías siguiendo el protocolo estándar. Básicamente, 3µg del ADN total bacteriano de cada aislado fue sonificado obteniendo fragmentos de aproximadamente 200 pb. Los fragmentos fueron reparados y etiquetados utilizando el quit Library Builder kit (product number 446372; Life Techonologies, EEUU), y Library Builder robot (product number 4463592; Life Techonologies, EEUU). Se generaron *reads* con extremos pareados de

75 pb más 35 pb para cada libería, por tanto 10 millones de *reads* fueron mapeadas en el genoma parental de referencia en todos los casos, con al menos un *coverage* de 300. Utilizamos el software de LifeScope v2.5.º (Life Technologies, EEUU) para encontrar mutaciones puntuales (*single nucleotide polymorphism*, SNP).

Análisis estadístico

Realizamos el análisis estadístico utilizando R (Versión 2.14.1). La influencia del NCP y del *fitness* bacteriano en los niveles de resistencia en las diferentes líneas fue analizado mediante el ajuste de un modelo lineal de efectos mixtos utilizando la función lmer del pack lme4 del software estadístico R (R 2.14.1M <http://www.r-project.org/>). El *fitness* y los plásmidos fueron tratados como variables explicativas continuas y la CMI como respuesta. Los puntos temporales 10 y 20 (días 10 y 20) y las diferentes líneas evolucionadas (5 por tratamiento) fueron incluidos como factores aleatorios para corregir la no independencia de los datos. La significancia fue determinada mediante un test chi-cuadrado y el ajuste del modelo fue determinado mediante inspección visual de los residuos. Estimamos los parámetros del modelo con los métodos de restricción de máxima probabilidad.

4.1.4. Resultados y Discusión

Diseño Experimental

Transformamos *H. influenzae* Rd con el plásmido pB1000 (San Millan, Escudero *et al.* 2009). El plásmido pB1000 presentaba alta estabilidad en *H. influenzae* Rd: después de 200 generaciones de cultivo en medio libre de antibióticos, todos los clones testados mantenían el plásmido. Para analizar el potencial de la adaptación plásmido/bacteria durante un tratamiento antibiótico, establecimos el siguiente diseño experimental (Figura 25). Propagamos 5 réplicas independientes de Rd/pB1000 en un experimento con dos fases (a partir de ahora llamadas Rd/pB1000A) (Tabla 5, Figura 20). En la fase uno emulamos un tratamiento antibiótico de 10 días: propagamos las poblaciones Rd/pB1000A durante diez días utilizando un factor de dilución 1/1000 (aproximadamente 10 generaciones por día) en HTM con 64 mg/L de ampicilina. Esta concentración corresponde a 1/8 de la CMI de Rd/pB1000 y es la similar al pico de

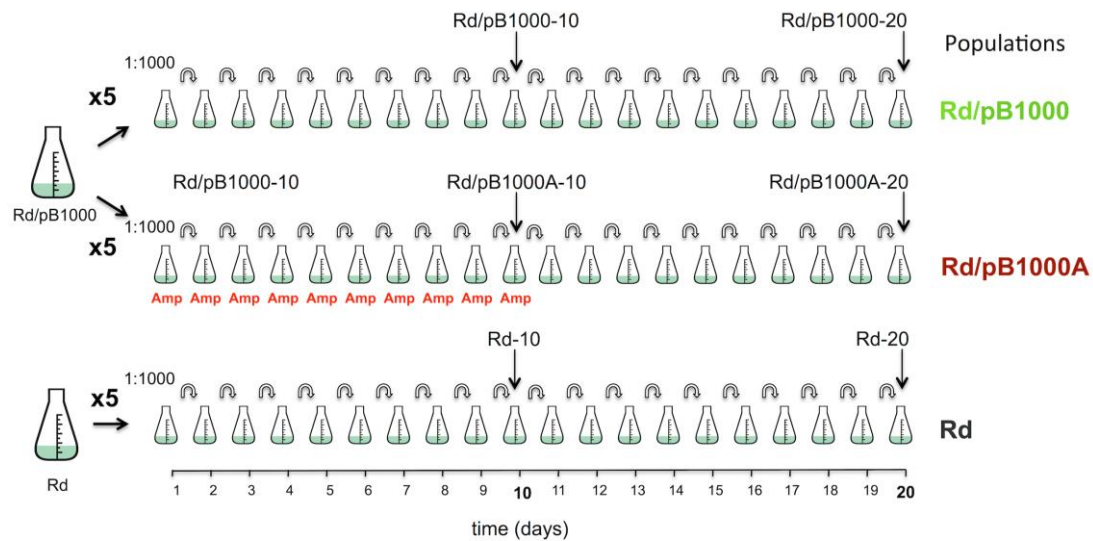


Figura 20. Evolución experimental simulando un tratamiento antibiótico con ampicilina.

Cinco poblaciones de *H. influenzae* rd KW20 portando el plásmido pequeño pB1000 (Rd/pB1000A) fueron propagadas durante 10 días en presencia de ampicilina (64 mg/L) y diez días más en ausencia de presión, con un factor de dilución de 1000 (aproximadamente 10 generaciones por día). Como control, cinco poblaciones de *H. influenzae* Rd KW20 (rd) y cinco poblaciones de Rd/pB1000 (Rd/pB1000) fueron cultivadas en las mismas condiciones pero sin presión antibiótica. En los días 10 y 20 (flechas negras verticales) estimamos el número de copias, el *fitness* relativo y el nivel de resistencia de todas las poblaciones. Figura modificada de San Millan, Santos-Lopez *et al.* 2015.

concentración máxima en paciente bajo tratamientos normales de ampicilina (Meyers, Wilkinson *et al.* 1991, Lacy, Lu *et al.* 1999). En la fase dos, investigamos la readaptación a un escenario no selectivo, propagando las poblaciones durante 10 días más en ausencia de presión antibiótica.

Realizamos dos experimentos controles: i) para analizar la influencia de la ampicilina en la evolución de Rd/pB1000, propagamos cinco poblaciones independientes de la cepa en ausencia de ampicilina durante 20 días (poblaciones Rd/pB1000) (Tabla 5; Figura 20), y ii) para determinar la influencia del plásmido pB1000 en la evolución de *H. influenzae* Rd, propagamos 5 poblaciones de la cepa Rd (sin el plásmido) en ausencia de presión selectiva durante 20 días (poblaciones Rd) (Tabla 5, Figura 20). En todas las líneas evolucionadas medimos en los días 0, 10 y 20: i) el *fitness* bacteriano, ii) el nivel de resistencia a ampicilina, y iii) el PCN (entendido como media de PCN por cada cromosoma en la población)

Evolución del *fitness* bacteriano.

Medimos el coste biológico producido por pB1000 en la cepa Rd mediante experimentos de competición directa (Figura 5) entre Rd y Rd/pB1000 sin presión antibiótica. Calculamos el *fitness* de Rd/pB1000 utilizando el coeficiente de selección relativo a la cepa parental *H. influenzae* Rd (*s*) (Materiales y Métodos de este capítulo). El plásmido pB1000 produce una disminución del *fitness* de un 5,67% [*s*= 0,056); desviación estándar (DE)= 0,0038] bajo nuestras condiciones experimentales. Posteriormente, determinamos el *fitness* de cada población en los días 10 y 20. Con este experimento, contestábamos una cuestión muy importante: ¿El *fitness* de Rd/pB1000 incrementará lo suficientemente rápido durante el tratamiento antibiótico simulado para compensar el coste biológico impuesto por el plásmido? En la figura 21 presentamos los *fitness* relativos en las diferentes poblaciones a lo largo del experimento.

Observamos un incremento del crecimiento a lo largo del tiempo en los tres tratamientos (Rd, Rd/pB1000 y Rd/pB1000A). Interesantemente, la diferencia inicial del *fitness* producida por pB1000 desaparece después de los primeros diez días del experimento, como se ve en la ausencia de diferencias en el *fitness* entre las poblaciones de Rd, Rd/pB1000 y Rd/pB1000A (ANOVA, *P*= 0,377, *F*= 0,837, y gl= 1, 13). En el día 20 no existían diferencias en el *fitness* entre las poblaciones sin el plásmido y las poblaciones Rd/pB1000A (*two-sample t-test*, *P* = 0.114, *t*= 1.81, y gl= 6, 9). Las poblaciones que portaban el plásmido propagadas sin presión antibiótica durante 20 días, mostraban un *fitness* menor que las cepas libres de plásmido bajo las mismas condiciones (*two-sample t-test*, *P*= 0.013, *t*= 3.21, and gl= 8).

H. influenzae Rd fue capaz de compensar el coste biológico impuesto por pB1000 en solo 10 días, y, tras 20 días, no había diferencia en el crecimiento entre las poblaciones tratadas con ampicilina y las cepas control sin el plásmido. Estos resultados muestran como Rd/pB1000 compensa el coste biológico del plásmido durante un tratamiento antibiótico simulado, incrementando de tal modo, la estabilidad del plásmido en la población bacteriana después del tratamiento.

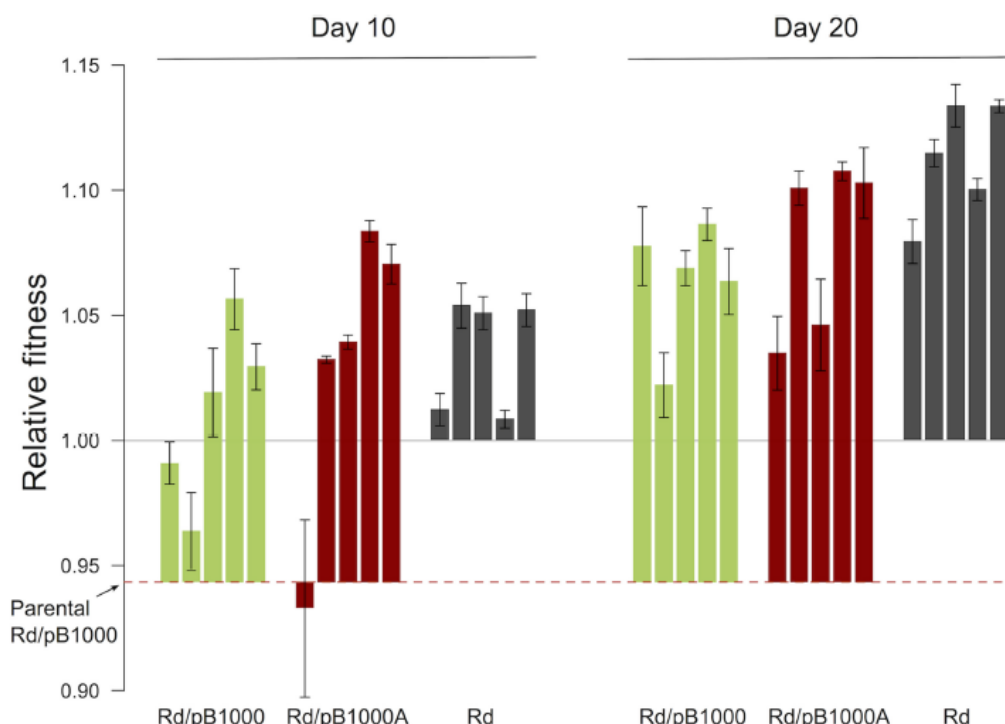


Figura 21. Fitness de las poblaciones evolucionadas

Los *fitness* relativos de las diferentes poblaciones comparado con el *fitness* de la cepa ancestral *H. influenzae* Rd KW20 junto con el error estándar de las medias (EEM) se muestran en la figura. La línea punteada roja representa el *fitness* de la cepa *H. influenzae* Rd parental portando el plásmido pB1000 (Rd/pB1000). Las barras verdes representan los *fitness* relativos de las poblaciones Rd/pB1000 propagadas en ausencia de antibióticos. Las barras rojas representan el *fitness* relativo de las cinco poblaciones propagadas en presencia de antibiótico durante 10 días seguidos de 10 días más en ausencia de presión (Rd/pB1000A). Las barras grises representan los *fitness* relativos de las cinco poblaciones Rd (sin el plásmido) evolucionadas en ausencia de antibióticos. Imagen obtenida de San Millan, Santos-Lopez *et al.* 2015

Aumento del nivel de resistencia a lo largo del tiempo

Determinamos las CMI a ampicilina para las cepas Rd y Rd/pB1000 parentales, y para las diferentes poblaciones en los días 10 y 20 del experimento (ver figuras 20 y 22). La cepa Rd mostró una CMI de 0,25 mg/L. En esta cepa, la CMI se mantuvo constante en las poblaciones a lo largo del experimento. La CMI a ampicilina de la cepa parental Rd/pB1000 fue de 512 mg/L (DE= 0 mg/L). Rd/pB1000A propagadas con ampicilina mostraron una CMI de 2.150 mg/L (DE= 465 mg/L) después de diez días; este resultado era significativamente más alto que el de la cepa parental (*two-tailed paired t-test* $P= 0.001$, $t= 7,88$, and $gl= 4$). El nivel de resistencia en Rd/pB1000A fue también superior al del control (Rd/pB1000)

evolucionado durante diez días en ausencia de antibióticos [1.075 mg/L (DE= 458 mg/L)]; (*two-sample t-test* $P=0,007$, $t= 3,64$, and $gl= 7, 9$). Por tanto concluimos que la presencia de ampicilina inducía un aumento del nivel de resistencia en Rd/pB1000. Las poblaciones control de Rd/pB1000 el día diez, no mostraban un aumento significativo comparado con la cepa parental (*two-tailed paired t-test*, $P= 0,089$, $t= 2,24$, and $gl= 4$), aunque la media de la CMI en esas poblaciones fue inesperadamente más alta que en la cepa Rd/pB1000 parental (Figura 22)

Después del tratamiento antibiótico, las poblaciones de Rd/pB1000A fueron propagadas durante 10 días más en ausencia de ampicilina. La CMI después de los 20 días (media= 1.843 mg/L, DE= 618 mg/L) permaneció más alta que la cepa parental (*two-tailed paired t-test*, $P= 0,012$, $t= 4,35$, and $gl= 4$), y similar al día diez (*two-tailed paired t-test*, $P= 0,801$, $t= 0,26$, and $gl= 6, 5$). Interesantemente, las poblaciones de

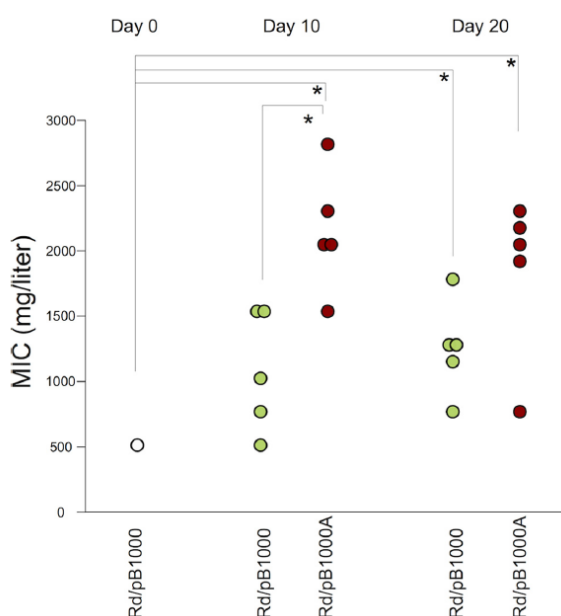


Figura 22. Evolución del nivel de resistencia a ampicilina.

Las CMIs (mg/L) de ampicilina en las diferentes poblaciones los días 0, 10 y 20 se muestran en la figura. El círculo blanco representa la CMI de la cepa *H. influenzae* Rd KW20 parental portando el plásmido pB1000. Los círculos verdes representan las cinco poblaciones de Rd/pB1000 propagadas en ausencia de ampicilina, mientras que los círculos rojos indican las CMIs de las cinco poblaciones de Rd/pB1000A evolucionadas 10 días con ampicilina seguidas de 10 días sin presión. Los asteriscos denotan diferencias significativas ($P<0,05$). Imagen obtenida de San Millan, Santos-Lopez *et al.* 2015

Rd/pB1000 evolucionadas en la ausencia de presión antibiótica durante 20 días, también mostraron un aumento significativo de la resistencia a ampicilina comparado con la cepa parental Rd/pB1000 (media= 1.252 mg/L, DE= 363 mg/L; *two-tailed paired t-test*, $P= 0,01$, $t= 4,56$, and $gl= 4$). Estos resultados sugieren que las cepas portando plásmidos son capaces de aumentar la resistencia a antibiótico mediante dos mecanismos. Un mecanismo está asociado con la presencia de ampicilina y aparece el día 10 en Rd/pB1000A, mientras el otro mecanismo se hace evidente en ausencia de antibióticos y es significativo después de 20 días (Figura 22).

La ampicilina provoca un aumento del número de copias de pB1000

Primero analizamos el mecanismo por detrás del aumento de la resistencia a antibióticos de Rd/pB1000 asociado a la presencia de ampicilina. Secuenciamos completamente los plásmidos pB1000, que portan la β -lactamasa *bla*_{ROB-1}, en las cinco poblaciones de Rd/pB1000A el día 10 (Rd/pB1000A-10) y también de dos de las poblaciones controles evolucionadas en ausencia de antibiótico (Rd/pB1000-10). No encontramos ninguna mutación en ninguno de los siete plásmidos comparados con el plásmido pB1000 parental. Trabajos anteriores habían demostrado que la

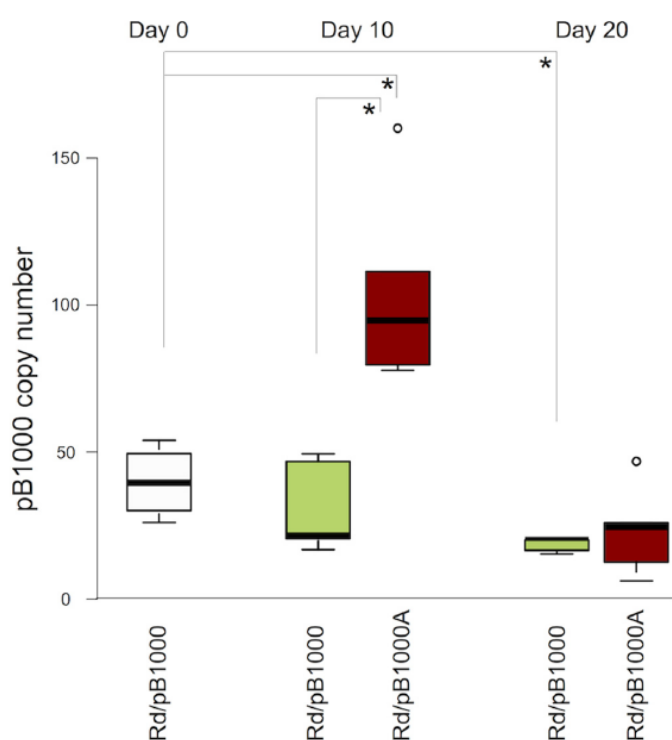


Figura 23. Modificación del número de copias de pB1000 a lo largo del tiempo

Representación gráfica de la distribución del número de copias de los plásmidos los días 0, 10 y 20. La línea dentro de las cajas corresponde a la mediana. Las bisagras por encima y por debajo de las cajas corresponden a los percentiles 25° y 75°. Los bigotes por encima por debajo se extienden hasta el valor más alto y más bajo. Los *outliers* están representados por círculos. La caja blanca representa el número de copias de pB1000 en la cepa parental Rd/pB1000. Las cajas rojas indican el número de copias de pB1000 de las cinco poblaciones Rd/pB1000A (evolucionadas durante 10 días con ampicilina y otros 10 días sin presión), y las cajas verdes indican el número de copias de pB1000 en las cinco poblaciones de Rd/pB1000 (propagadas en ausencia de ampicilina). Los asteriscos denotan diferencias significativas ($P < 0,05$). Figura obtenida de San Millán, Santos-Lopez *et al.* 2015.

resistencia mediada por β -lactámicos en *H. influenzae* puede incrementar mediante mutaciones en el gen *ftsI*, que codifica la *penicillin binding protein 3*, la diana de la ampicilina (Tristram, Jacobs *et al.* 2007, San Millán, Giufré *et al.* 2011). Por tanto secuenciamos el gen *ftsI* de 15 clones (3 clones de cada población Rd/pB1000A-10) y no encontramos ninguna mutación. Por tanto las mutaciones en *bla*_{ROB-1} no podían ser las responsables del aumento de la resistencia bajo presión antibiótica.

Una explicación alternativa para el aumento del nivel de resistencia a ampicilina, es el aumento en el número de copias de pB1000, que podría incrementar el

número de copias de *bla*_{ROB-1} y por tanto su expresión (Uhlen y Nordstrom 1977). El aumento del nivel de resistencia debido a un número de plásmidos elevados ha sido descrito previamente en plásmidos pequeños de *staphylococcus* (Luthje, von Kockritz-Blickwede *et al.* 2007). El plásmido pB1000 mostró una media de 44,5 (ED= 9,9) en la cepa *H. influenzae* Rd/pB1000 parental. En la figura 23, mostramos el número de copias de plásmidos en las diferentes poblaciones de Rd/pB1000 y Rd/pB1000A. interesantemente, hay un aumento significativo del PCN de pB1000 el día diez en las poblaciones propagadas con ampicilina (media= 104,8; DE= 33,8) comparado tanto con la cepa parental (*two-sample t-test*, $P = 0.014$, $t = 3,73$; and $gl = 5$) como con las poblaciones evolucionadas en la ausencia de antibióticos (media= 31,06; DE= 15,7) (*two-sample t-test*, $P = 0,005$; $t = 4,42$; and $gl = 5,6$). Además encontramos correlación positiva entre el número de copias de pB1000 y la CMI a ampicilina en Rd/pB1000-10 y Rd/pB1000A-10 (*Pearson's test*, $r = 0,675$; $P = 0,032$; $t = 2.59$, and $gl = 8$). Estos resultados apoyan la idea de que el aumento del número de copias puede contribuir a una subida en el nivel de resistencia a ampicilina. Para analizar las bases genéticas del aumento del PCN de pB1000, secuenciamos masivamente muestras de ADN de 4 de las poblaciones evolucionadas experimentalmente los días 10 y 20 (Figura 20). Ninguna de las mutaciones que detectamos pudo explicar directamente el aumento del PCN. En el apartado 1.5, presentamos el análisis y la interpretación de los resultados de la secuenciación.

Una vez que la presencia de ampicilina fue retirada, el NCP de pB1000 disminuyó el día 20 en Rd/pB1000A (media= 23,80; DE= 14,8) a niveles similares de la cepa parental (*two-sample t-test*, $P = 0,057$; $t = 2,37$, and $gl = 5,8$) (Figura 23). Además, en las poblaciones de Rd/pB1000 control evolucionadas en ausencia de presión, el NCP parece que disminuyó progresivamente, mostrando una reducción significativa el día 20 comparado con la cepa parental (media= 18,43; DE=2,3) (*two-sample t-test*, $P = 0,041$; $t = 4,4807$; and $gl = 2,1$). Por tanto, el PCN no era el responsable del aumento del nivel de resistencia en las cepas portando plásmidos en el día 20

Nuestros experimentos demostraron como la presencia del antibiótico β -lactámico produjo un aumento del PCN del plásmido pequeño pB1000, correlacionado con el aumento del nivel de resistencia en la cepa. Por otro lado, en ausencia de presión antibiótica, el PCN mostró una disminución progresiva, que en

principio, podría contribuir a disminuir el coste biológico asociado con pB1000 cuando la resistencia a ampicilina no fuese requerida (Patnaik 2000, Harrison, Koufopanou *et al.* 2012). Estos resultados indicaron que la variación en PCN podría ayudar a la bacteria a adaptarse a diferentes ambientes.

Las mejoras en el *fitness* bacteriano aumentan el nivel de resistencia en los clones portando plásmidos.

Un Segundo mecanismo, independiente de la presencia de ampicilina, provoca un aumento de la resistencia a ampicilina. Este mecanismo se observó solamente en las cepas portando pB1000. Estudios anteriores han demostrado que las mejoras en el crecimiento de una bacteria que porta determinantes de resistencia, puede suponer un aumento del nivel de resistencia en esa cepa. (Marcusson, Frimodt-Moller *et al.* 2009, Albarracin Orio, Pinas *et al.* 2011).

Para testar si las mejoras generales en el *fitness* eran las responsables del aumento del nivel de resistencia a ampicilina en las poblaciones que portaban pB1000, utilizamos las cepas evolucionadas sin plásmido (Rd). Las cinco líneas de Rd-20 propagadas sin presión plásmido, mostraron un incremento significativo del *fitness* relativo durante el experimento (media= 11,23%, DE= 2,3%) (Figura 24). Si el aumento general del *fitness* es el responsable del incremento del fenotipo de resistencia en las cepas portando el plásmido, es razonable pensar que si transformamos la cepa evolucionada con mejor *fitness* de Rd-20 con pB1000, se generarán cepas con un nivel de resistencia más alto que la cepa parental Rd/pB1000. Por tanto transformamos un clon de cada población Rd-20 con el plásmido pB1000 parental (Rd-20/pB1000). Primero, determinamos el PCN de pB1000 en los transformantes (media= 16,47; DE=6,52), y era menor que el de la cepa parental de Rd/pB1000 (*two-sample t-test*, $P= 0,021$; $t= 4,36$, and $gl= 5,7$), pero similar a Rd/pB1000 evolucionado 20 días (Rd/pB1000-20) (*two-sample t-test*, $P= 0,554$; $t= 0,63$; and $gl= 5,6$). Segundo, investigamos el *fitness* relativo de las cepas Rd-20/pb1000 y fue aproximadamente un 11% superior que en la cepa Rd/pB1000 original (Figura 24). Finalmente la CMI a ampicilina de las cinco construcciones Rd-20/pB1000 fue de 900 mg/L (DE= 50,93 mg/L), superior al nivel de resistencia de la cepa Rd/pB1000 original (media= 512 mg/L, DE= 0 mg/L) (*two-sample t-test*, $P=$

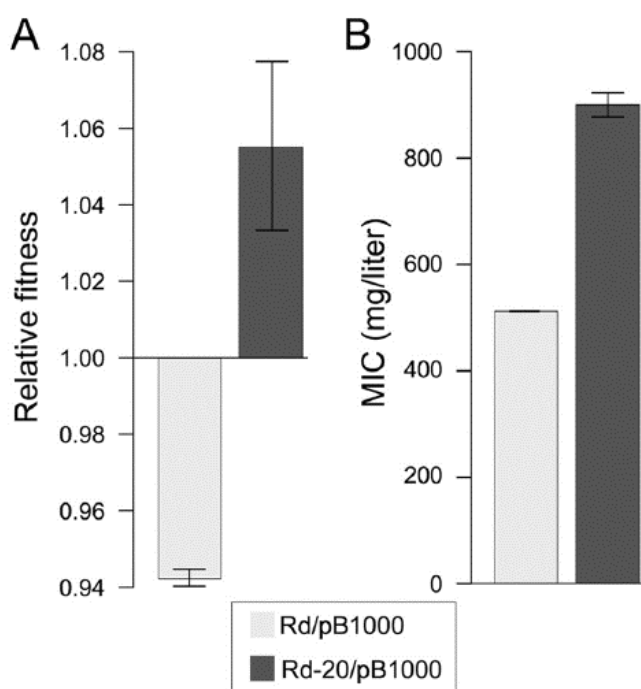


Figura 24. Mejoras en el crecimiento bacteriano aumentan el nivel de resistencia en los clones que portan plásmidos.

Las poblaciones Rd propagadas durante 20 días fueron transformadas con el plásmido original pB1000 (Rd-20/pB1000). (A) Los *fitness* relativos (media y ESM) de la cepa original Rd/pB1000 (barras gris claro) comparados con el *fitness* relativo del ancestro *H. influenzae* Rd KW20 sin el plásmido (B) CMI (y ESM) a ampicilina de los mismos clones. Figura obtenida de San Millán Santos-López *et al.* 2015.

0,001, $t = 38,66$, and $gl = 4$) (Figura 25). Dado que el PCN de pB1000 es menor en Rd-20/pB1000 que en Rd/pB1000, el hecho de que la CMI de ampicilina se vea aumentado, aporta evidencias contundentes sobre que el aumento en el *fitness* es el responsable del incremento del nivel de resistencia en las líneas portando pB1000.

Para determinar si el aumento del *fitness* relativo pudiese estar afectando el nivel de resistencia a otros antibióticos diferentes que la ampicilina, medimos la CMI de todas las

poblaciones en el día 20 del experimento, a dos antibióticos clínicamente relevantes en las infecciones de *H. influenzae*: cloranfenicol y tetraciclina (Tristram, Jacobs *et al.* 2007). La CMI de las cepas parentales Rd y Rd/pB1000 fue de 0,5 mg/L para ambos antibióticos. No hubo cambios en las CMIs a cloranfenicol o a tetraciclina en las poblaciones evolucionadas. Estos resultados apoyan la observación inicial de que el aumento de la resistencia a ampicilina mediado por mejoras en el *fitness* estaba unido a la presencia del plásmido de resistencia pB1000. Por tanto, parece que en este sistema, la presencia del mecanismo que genera la resistencia al antibiótico, es necesaria para que las mejoras en el *fitness* tengan efecto en el nivel de resistencia de la cepa.

El número de copias de los plásmidos y el *fitness* bacteriano contribuyen independientemente al aumento de la resistencia a ampicilina en Rd/pB1000

Los resultados presentados aquí, sugieren que tanto el aumento del PCN como las mejoras en el *fitness* están relacionadas con el incremento del nivel de resistencia de Rd/pB1000. (Figura 25). Para analizar si ambos mecanismos contribuyen al fenotipo de resistencia en las poblaciones evolucionadas que portaban el plásmido, ajustamos un modelo lineal de efectos mixtos donde el *fitness* relativo y el PCN de pB1000 de las poblaciones Rd/pB1000A y Rd/pB1000 (en los días 10 y 20) fueron tratados como variables explicativas continuas y el nivel de resistencia (CMI a ampicilina) como la respuesta. (Figura 25). Incluimos dos factores aleatorios para corregir la no independencia de los datos de la misma línea (en puntos diferentes) o del mismo punto temporal (días 10 y días 20) en diferentes líneas. Tanto el NCP (*chi-square test*, $P=0,004$; $\chi^2=8,39$; $gl=1$) como el *fitness* bacteriano (*chi-square test*, $P=0,007$; $\chi^2=$

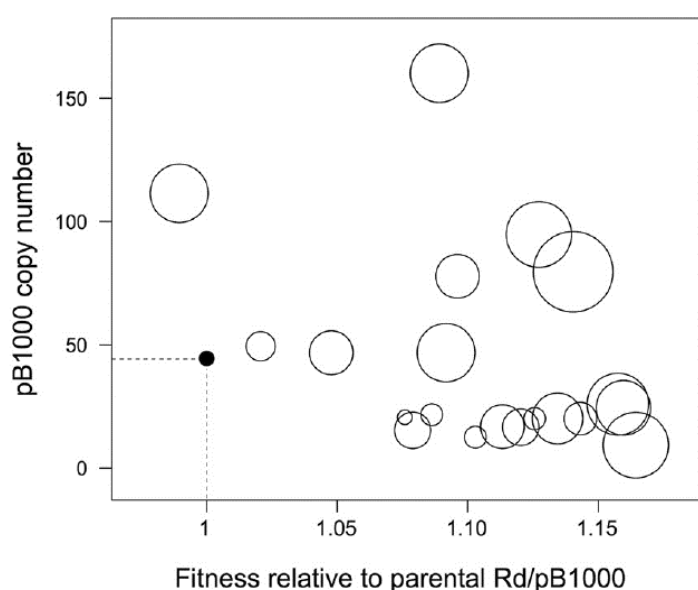


Figura 25. El número de copias de los plásmidos y el *fitness* bacteriano determinan el nivel de resistencia a antibióticos.

Representación de los efectos del número de copias (eje Y) y del aumento del *fitness* relativo (relativo a la cepa parental *H. influenzae* Rd KW20 portando el plásmido pB1000) (eje x) en el nivel de resistencia a ampicilina de las 20 poblaciones de *H. influenzae* Rd KW20 portando pB1000 (cinco Rd/pB1000 y cinco Rd/pB1000A, días 10 y 20) analizados. El círculo sólido definido por las líneas punteadas representan los valores de la cepa Rd/pB1000 parental. Los tamaños de los círculos son proporcionales a la CMI de ampicilina de las poblaciones. Tanto el número de copias como el *fitness* contribuyen independientemente al nivel de resistencia a ampicilina que muestran las poblaciones. Figura obtenida de San Millan, Santos-Lopez *et al.* 2015.

7,38; $gl=1$) tuvieron un efecto significativo en el nivel de resistencia a ampicilina en las poblaciones. No había interacción entre las dos variables (*chi-square test*, $P=0,571$; $\chi^2=0,32$; $gl=1$), apoyando la hipótesis de que el PCN y el *fitness* contribuyen

independientemente al aumento del nivel de resistencia en *H. influenzae* Rd portando el plásmido pB1000.

4.1.5. Conclusiones

Este estudio genera nuevas evidencias del potencial de los tratamientos antibióticos en las adaptaciones a corto plazo de los plásmidos que portan determinante de resistencia y sus hospedadores bacterianos. El coste biológico producido por los plásmidos es temporal y puede ser rápidamente disminuido, sugiriendo que el plásmido produce un coste biológico substancial solamente cuando se adquiere *de novo* por el hospedador bacteriano. Esta rápida adaptación plásmido/hospedador podría explicar cómo los plásmidos persisten en las poblaciones durante largos periodos incluso en ausencia de selección para los determinantes codificados por los plásmidos, o en ausencia de transferencias horizontales (San Millan, Peña-Miller *et al.* 2014). También demostramos cómo el número de copias del plásmido varía a lo largo del tiempo, facilitando la adaptación de la bacteria a ambientes cambiantes. Finalmente observamos que el aumento tanto del PCN como del *fitness* bacteriano, contribuyen a mejorar el nivel de resistencia de *H. influenzae*.

4.1.6. Material suplementario

Bases moleculares del aumento del número de copias de pB1000

Investigamos las bases genéticas del aumento de las copias de pB1000 observadas tras el tratamiento con ampicilina. Los plásmidos ColE1 regulan sus propios números de copias mediante ARNs (ARNI y ARNII) (Lacatena y Cesareni 1981, Cesareni, Muesing *et al.* 1982, Fitzwater, Zhang *et al.* 1988, Wang, Yuan *et al.* 2004) (Sección 2.3.1 de la tesis doctoral, Figura 14). Además, mutaciones en genes cromosómicos pueden afectar al NCP de los plásmidos ColE1 (Bassett y Kushner 1984, Chiang, Xu *et al.* 1991, Xu, Lin-Chao *et al.* 1993, Jung and Lee 1995, Yang y Polisky 1999, Ederth, Isaksson *et al.* 2002). Obtuvimos la secuencia nucleotídica de pB1000 de las cinco poblaciones de Rd/pB1000A-10 y de dos poblaciones del control Rd/pB1000-10 y no encontramos ninguna mutación entre ellas. Secuenciamos masivamente 4 poblaciones de los días 10 y 20: dos poblaciones de Rd/pB1000A, una población de Rd/pB1000 control y una población de la cepa Rd sin el plásmido. En las tablas 6 y 7, presentamos el análisis e interpretación de las mutaciones identificadas en las ocho poblaciones evolucionadas. De nuevo, pB1000 no mostró ninguna mutación. Solamente detectamos una mutación cromosómica (1 de 34) donde las mutaciones solamente estaban asociadas con las poblaciones que mostraban un aumento del número de copias (Rd/pB1000-10.1 y Rd/pB1000A-10.2). Esta mutación estaba en un ARNt de arginina (HI0642.2). Los ARNts han sido asociados con modificaciones en el número de copias de plásmidos tipo ColE1 en *E. coli* (Wang, Yuan *et al.* 2006) (Apartado 2.3.2 de esta tesis doctoral). Sin embargo, las mutaciones del ARNt de arginina solamente estaban presentes en el 13% de los *reads* de las poblaciones Rd/pB1000-10A.1 y Rd/pB1000-10A.2 (Tabla 7). Por tanto investigamos si el PCN y la secuencia del ARNt de arginina. No encontramos ninguna asociación entre el aumento del PCN y la mutación en el gen entre los diferentes clones testados (datos no mostrados). Por tanto, no fuimos capaces de determinar las bases genéticas del aumento del número de copias de pB1000. Alternativamente, se podría especular si el aumento del PCN de pB1000 se debe a eventos regulatorios desconocidos o a la selección de las cepas portando mayor número de copias de pB1000 debido a la variación fenotípica. Se necesitarán nuevos trabajos para determinar el origen de esta variación del número de copias.

Tabla 6. Resumen de las mutaciones encontradas en las poblaciones

Poblaciones ^a								Gen ^b	Grupo de Ortólogos ^c	Tipo de mutación ^d
Rd		Rd/pB1000A.1		Rd/pB1000A.2		Rd/pB1000				
10	20	10	20	10	20	10	20			
								HI0380.2 (ARNt Lisina)	ND	NA (ARNt)
								HI0642.3 (ARNt Arginina)	ND	NA (ARNt)
								HI0642.2 (ARNt Arginina)	ND	NA (ARNt)
								HI0635 (a)	M	No sinónima
								HI0635 (b)	M	No sinónima
								HI0147	M	No sinónima
								<i>sdaC</i>	M	No sinónima
								HI1317	M	Sinónima
								<i>ppnK</i>	M	No sinónima
								HI1364	IS	No sinónima
								HI0220.2	IS	No sinónima
								<i>mutS</i>	IS	Sinónima
								<i>lpp</i>	CP	No sinónima
								<i>ureF</i>	CP	No sinónima
								HI0559.1	FU	No sinónima
								HI1254	ND	NA (Pseudogen)
								HI0956	ND	NA (Pseudogen)
								<i>dcuB</i>	ND	NA (Pseudogen)
								<i>lctP/cmk</i>	M / M	NA (Intergénica)
								<i>pepT</i> /HI1349	M / M	NA (Intergénica)
								<i>accB/accC</i>	M/ M	NA (Intergénica)
								HI0736/HI0737	M / CP	NA (Intergénica)
								<i>fabA</i> /HI1326	M / GF	NA (Intergénica)
								<i>frdA/genX</i>	M/ GF	NA (Intergénica)
								<i>pmrA</i> /HI0979	CP, IS, M / M	NA (Intergénica)
								HI1051/HI1052	CP, M / IS	NA (Intergénica)
								<i>glmU</i> /HI0642a	CP, M / FU	NA (Intergénica)
								<i>potC/potB</i>	CP / M	NA (Intergénica)
								<i>spot/ropZ</i>	CP, IS / IS	NA (Intergénica)
								<i>hsdS</i> /HI0217	CP / IS	NA (Intergénica)
								HI1503/HI1504	GF / FU	NA (Intergénica)
								HI1564/HI1565m (b)	FU / ND	NA (Intergénica)
								HI1564/HI1565m (a)	FU / ND	NA (Intergénica)
								<i>devB/zwf</i>	ND / GF	NA (Intergénica)

Mutaciones puntuales encontradas en la secuencia de las poblaciones compradas con el genoma de la cepa Rd KW20 (número de acceso: NC_000907). ^a Poblaciones

(arriba) y tiempo (abajo); las casillas grises indican alelo salvaje; las casillas azules indican mutación comparado con el genoma de referencia.^b Los nombres de los genes en los que la mutación ha sido encontrada están indicados; las mutaciones en las regiones intergénicas tienen los dos genes adyacentes (ejemplo *lctP/cmK*).^c Categoría de ortólogos: Función general (GF), Proceso Celular (CP), Información, almacenamiento y procesamiento (IS), Metabolismo (M), y no determinado (ND)^d NA, No Aplicable.

Tabla 7. Descripción y análisis de las mutaciones encontradas en las poblaciones evolucionadas experimentalmente

Población	Posición en el Genoma	Gen	Función	Tipo de Gen	GO ^a	Nucleótido Original	Nucleótido evolucionado	Longitud del gen (nt, aa)	Posición intergénica	Cambio aminoácido	Score ^b	Coverage ^c	Conteo del alelo de referencia ^d	Conteo del alelo mutado ^e
Rd-10	401937	HI0380.2	ARNt Lisina	ARNt	-	A	R	98	-	-	0	188	137	29
	677154	HI0635	Proteína de unión a la hemoglobina	Proteína codificante	M1	T	Y	3159, 1052	-	Ile233Val	0,069495	8	2	6
	677157	HI0635	Proteína de unión a la hemoglobina	Proteína codificante	M1	T	Y	3159, 1052	-	Ile233Val	0,076728	8	2	6
	684885	HI0642.3	ARNt Arginina	ARNt	-	T	Y	99	-	-	0	156	99	27
	752279	<i>mutS</i>	Proteína de reparación de errores en el ADN	Proteína codificante	IS1	G	R	2586, 861	-	NO	0	288	143	129
	791743	HI0736/HI0737	Transportador dependiente de sodio/ Acetohydroxy acid synthase II	Proteína codificante / Proteína codificante	GF, M2, M3, M4 / GF, FU, CP1	C	M	-	-1745/-29	-	0	196	151	27
	1037047	<i>pmrA</i> /HI0979	Metiltransferasas de la proteína L11 del ribosoma / Proteína Hipotética. Los miembros de esta familia catalizan la reducción de la unión doble 5,6 de un residuo uridina en un ARNt	Proteína codificante / Proteína codificante	GF, CP2, IS2, M2, M8 / GF, M1, M2, M3, M4	T	W	-	+1670/-74	-	0,023056	13	3	7
	1425821	<i>pepT</i> /HI1349	Cataliza la separación del N-terminal de un tripéptido/ Proteína hipotética de unión	Proteína codificante / Proteína	M2 / M5	C	Y	-	+140/+424	-	0,074359	18	3	11

			al ADN tipo ferritina (protectora de daño oxidativo)	codificante										
Rd-20	162573	HI0147	Proteína hipotética. Receptora del complejo hemoglobina del hospedador humano. Requerido para la toma del grupo hemo	Proteína codificante	M1	C	M	1902, 633	-	Pro6Thr	0	16	6	6
	323942	<i>sdaC</i>	Transportador de serina	Proteína codificante	M2	C	M	1239, 412	-	Gly399Val	0	422	257	160
	401937	HI0380.2	ARNt Lisina	ARNt	-	A	R	98	-	-	0	168	118	30
	677157	HI0635	Proteína de unión a la hemoglobina	Proteína codificante	M1	T	Y	3159, 1052	-	Ile233Val	0,062513	10	2	5
	684447	<i>glmU</i> /HI0642a	Cataliza la acetilación de glucosamina-1-fosfato y la uridilación de N-acetilglucosamina-1-fosfato para producir UDP-GlcNAc/ Proteína hipotética sin dominios conservados	Proteína codificante / Proteína codificante	GF, CP3, M4, M8 / FU	T	W	-	+34/+5	-	0,003234	12	6	3
	752279	<i>mutS</i>	Proteína de reparación de errores en el ADN	Proteína codificante	IS1	G	R	2586, 861	-	NO	0	301	217	73
	1028638	<i>accB/accC</i>	Subunidad de la proteína Acetil-CoA carboxilasa biotina / Subunidad carboxilasa del Acetil-CoA carboxialasa biotina	Proteína codificante / Proteína codificante	M2/ M2	G	S	-	+34/-141	-	0,004022	16	4	8
	1104427	<i>ureF</i>	Proteína accesoria ureasa. Endonucleasa de restricción HindVp	Proteína codificante	CP2	C	Y	1005, 334	-	Pro6Leu	0	152	123	29
	1633665	HI1564/HI1565m	Proteína hipotética sin dominios conservados / Pseudogen. Similar a un receptor de membrana. Marcos de lectura artificiales	Proteína codificante / Pseudogen	FU / -	T	C	-	-386/-120	-	0,011352	6	1	4

	1647899	<i>lpp</i>	Lipoproteína asociada al peptidoglicano	Proteína codificante	CP3	A	R	468,155	-	Val142Ala	0,086994	3	1	2
Rd/pB1000A-10.1	170595	<i>dcuB</i>	Pseudogen. Similar al transportador anaerobico C4-dicarboxilato contains frameshifts	Pseudogen	-	C	Y	1731	-	-	0	66	55	10
	401937	HI0380.2	ARNt Lisina	ARNt	-	A	R	98	-	-	0	107	73	27
	677157	HI0635	Proteína de unión a la hemoglobina	Proteína codificante	M1	T	C	3159,1052	-	Ile233Val	0,01775	4	1	3
	685005	HI0642.2	ARNt Arginina	ARNt	-	G	R	99	-	-	0	75	50	10
	1104427	<i>ureF</i>	Proteína accesoria ureasa. Endonucleasa de restricción HindVp	Proteína codificante	CP2	C	Y	1005,334	-	Pro6Leu	0	74	56	18
	1394221	HI1317	Proteína hipotética. Superfamilia de la epimerasa de aldosa. Cataliza la interconversión de los anómeros α y β de las hexosas como la glucosa y la galactosa	Proteína codificante	M1	C	G	816,271	-	NO	0,005622	6	1	5
	1577705	HI1503/HI1504	Similar a la proteína G-1 del bacteriófago Mu / Similar a la poreína MU I del bacteriófago Mu	Proteína codificante / Proteína codificante	GF / FU	T	C	-	+168/-63	-	0,039779	26	18	4
Rd/pB1000A-20.1	170595	<i>dcuB</i>	Pseudogen. Similar al transportador anaerobico C4-dicarboxilato contains frameshifts	Pseudogen	-	C	Y	1731	-	-	0	121	93	22
	576724	<i>devB/zwf</i>	Pseudogen. Cataliza la formación de 6-fosfo-D-gluconato desde 6-fosfo-Dglucono-1,5-lactona / Cataliza la formación de D-glucono-1,5-lactona 6-fosfato desde D-glucosa 6-fosfato	Pseudogen / Proteína codificante	- / GF	A	R	-	-651/+167	-	0	39	13	13
	1014634	HI0956	Pseudogen. Función desconocida	Pseudogen	-	G	A	329	-	-	0	58	0	39

1037048	<i>pmrA</i> /HI0979	Metiltransferasas de la proteína L11 del ribosoma / Proteína hipotética. Los miembros de esta familia catalizan la reducción del enlace doble 5,6 de un residuo uridina en el ARNt	Proteína codificante / Proteína codificante	GF, CP2, IS2, M2, M8 / GF, M1, M2, M3, M4	A	W	-	+1671/-73	-	0,084273	17	3	13	
1104427	<i>ureF</i>	Proteína accesoria ureasa. Endonucleasa de restricción HindVp	Proteína codificante	CP2	C	Y	1005, 334	-	Pro6Leu	0	141	117	23	
1117518	HI1051/HI1052	Proteína de unión a ATP de un transportador ABC / Regulador transcripcional de la familia AraC	Proteína codificante / Proteína codificante	CP2, CP4, M3, M5 / IS2	G	R	-	-21/+57	-	0,039609	9	4	2	
1330978	HI1254	Pseudogen. Función desconocida	Pseudogen	-	A	R	2560	-	-	0	59	50	9	
1405246	<i>fabA</i> /HI1326	Cataliza la deshidratación de (3R)-3-hidroxydecanoil-ACP a 2,3-decanoil-ACP o 3,4-decanoil-ACP Hypothetical protein / Cataliza la transferencia del grupo gamma-fosforil de ATP a los grupos hidroxilo en sustratos específicos como la serina, treonina o tirosina	Proteína codificante / Proteína codificante	GF, M6, M8 / GF	C	T	-	+61/-163	-	0,008479	14	2	9	
1425821	<i>pepT</i> /HI1349	Cataliza la separación del N-terminal de un tripéptido/ Proteína hipotética de unión al ADN tipo ferritina (protectora de daño oxidativo)	Proteína codificante / Proteína codificante	M2 / M5	C	T	-	+140/+424	-	0	49	3	34	

	1577705	HI1503/HI1504	Similar a la proteína G-1 del bacteriófago Mu / Similar a la proteína MU I del bacteriófago Mu	Proteína codificante / Proteína codificante	GF / FU	T	K	-	+168/-63	-	0	66	46	10
Rd/pB1000A-10.2	77924	<i>ppnK</i>	Kinasa polifosfato/ATP-NAD inorgánico	Proteína codificante	M1	A	W	786, 261	-	Ile257Asp	0	92	66	12
	401937	HI0380.2	ARNt Lisina	-	-	A	R	98	-	-	0	160	110	24
	576724	<i>devB/zwf</i>	Pseudogen. Cataliza la formación de 6-fosfo-D-gluconato desde 6-fosfo-Dglucono-1,5-lactona / Cataliza la formación de D-glucono-1,5-lactona 6-fosfato desde D-glucosa 6-fosfato from 6-phospho-D-glucono-1,5-lactone / Catalyzes the formation of D-glucono-1,5-lactone 6-phosphate from D-glucose 6-phosphate	Pseudogen / Proteína codificante	- / GF	A	R	-	-651/+167	-	0	23	10	6
	685005	HI0642.2	ARNt Arginina	ARNt	-	G	R	99	-	-	0	81	56	10
	1028638	<i>accB/accC</i>	Subunidad de la proteína Acetil-CoA carboxilasa biotina / Subunidad carboxilasa del Acetil-CoA carboxilasa biotina	Proteína codificante / Proteína codificante	M2/ M2	G	S	-	+31/-140	-	0,074954	6	2	3
	1104427	<i>ureF</i>	Proteína accesoria ureasa. Endonucleasa de restricción HindVp	Proteína codificante	CP2	C	Y	1005, 334	-	Pro6Leu	0	113	89	23
	1394221	HI1317	Proteína hipotética. Superfamilia de la epimerasa de aldosa. Cataliza la interconversión de los anómeros α y β de las hexosas como la glucosa y la galactosa	Proteína codificante	M1	C	S	816, 271	-	NO	0,000744	9	4	4
	1422175	<i>potC/potB</i>	Puede transportar	Proteína	CP4,	A	W	-	-16/+10	-	0,00172	12	6	3

			espermidina y putrescina pero con afinidad superior para la espermidina; forma un complejo PotA2BCD; PotC y PotB son componentes de membrana	codificante / Proteína codificante	M2 / M2									
	1425821	<i>pepT</i> /HI1349	Cataliza la separación del N-terminal de un tripéptido/ Proteína hipotética de unión al ADN tipo ferritina (protectora de daño oxidativo)	Proteína codificante / Proteína codificante	M2 / M5	C	Y	-	+140/+424	-	0,094592	24	3	13
	1633708	HI1564/HI1565m	Proteína hipotética sin dominios conservados / Pseudogen. Similar a un receptor de membrana. Marcos de lectura artificiales	Proteína codificante / Pseudogen	FU / -	A	R	-	-429/-77	-	0	76	63	12
	1633712	HI1564/HI1565m	Proteína hipotética sin dominios conservados / Pseudogen. Similar a un receptor de membrana. Marcos de lectura artificiales	Proteína codificante / Pseudogen	FU / -	C	Y	-	-433/-73	-	0	90	72	14
Rd/pB1000A-20.2	401937	HI0380.2	ARNt Lisina	ARNt	-	A	R	98	-	-	0	160	121	22
	579336	HI0559.1	Proteína hipotética sin dominios conservados detected	Proteína codificante	FU	A	W	348, 115	-	Leu114Stop	0	95	77	15
	885810	<i>frdA/genX</i>	Parte de los cuatro enzimocomplejos FrdABCD que catalizan la reducción de fumarato a succinato durante la respiración anaeróbica / ARN-t lisil sintetasa to succinate during anaerobic respiration	Proteína codificante / Proteína codificante	M7 / GF	G	T	-	-124/-88	-	0	43	0	40

	1014634	HI0956	Pseudogen. Función desconocida	Pseudogen	-	G	A	329	-	-	0	56	1	38
	1028637	<i>accB/accC</i>	Subunidad de la proteína Acetil-CoA carboxilasa biotina / Subunidad carboxilasa del Acetil-CoA carboxilasa biotina	Proteína codificante / Proteína codificante	M2/M2	C	S	-	+30/-141	-	0,090418	12	9	2
	1037048	<i>pmrA/</i> HI0979	Metiltransferasas de la proteína L11 del ribosoma / Proteína hipotética. Los miembros de esta familia catalizan la reducción del enlace doble 5,6 de un residuo uridina en el ARNt	Proteína codificante / Proteína codificante	GF, CP2, IS2, M2, M8 / GF, M1, M2, M3, M4	A	W	-	+1671/-73	-	0,095091	21	3	16
	1117518	HI1051/HI1052	Proteína de unión a ATP de un transportador ABC / Regulador transcripcional de la familia AraC	Proteína codificante / Proteína codificante	CP2, CP4, M3, M5 / IS2	G	R	-	-21/+57	-	0,00206	11	5	3
	1449977	HI1364	Regulador transcripcional de la familia de LysR	Proteína codificante	IS2	T	A	867, 288	-	Stop288Leu*	0	54	0	46
	1828827	<i>spot/ropZ</i>	Pirofosfohidrolasa Guanosin-3'5'-bis(difosfato) 3' / Subunidad omega de la RNA polimerasa	Proteína codificante / Proteína codificante	CP1, IS2 / IS2	G	K	-	-73/+107	-	0	59	37	10
Rd/pB1000-10	170595	<i>dcuB</i>	Pseudogen. Similar al transportador anaerobico C4-dicarboxilato contains frameshifts	Pseudogen	-	C	Y	1731	-	-	0	137	107	19
	234642	<i>hsdS/</i> HI0217	Proteína de restricción y modificación de ADN tipo I / Proteína hipotética tipo transposasa IS200	Proteína codificante / Proteína codificante	CP2 / IS1	T	K	-	+8/-121	-	0,080935	9	2	4
	241738	HI0220.2	Proteína hipotética, Uracil-ADN glicosilasa (UDG)	Proteína codificante	IS1	T	A	588, 195	-	Tyr129Phe	0	59	5	39

	684885	HI0642.3	ARNt Arginina	ARNt	-	T	Y	99	-	-	0	175	110	27
	1028638	<i>accB/accC</i>	Subunidad de la proteína Acetil-CoA carboxilasa biotina / Subunidad carboxilasa del Acetil-CoA carboxilasa biotina	Proteína codificante / Proteína codificante	M2/M2	G	S	-	+31/-140	-	0,013371	18	4	10
	1104427	<i>ureF</i>	Proteína accesoria ureasa. Endonucleasa de restricción HindVp	Proteína codificante	CP2	C	Y	1005, 334	-	Pro6Leu	0	164	139	25
	1394221	HI1317	Proteína hipotética. Superfamilia de la epimerasa de aldosa. Cataliza la interconversión de los anómeros α y β de las hexosas como la glucosa y la galactosa	Proteína codificante	M1	C	G	816, 271	-	NO	0,016544	15	2	10
	1405246	<i>fabA/Hi1326</i>	Cataliza la deshidratación de (3R)-3-hidroxidecanoil-ACP a 2,3-decenoil-ACP o 3,4-decenoil-ACPHypothetica protein. / Cataliza la transferencia del grupo gamma-fosforil de ATP a los grupos hidroxilo en sustratos específicos como la serina, treonina o tirosina	Proteína codificante / Proteína codificante	GF, M6, M8 / GF	C	T	-	+61/-163	-	0,019506	11	2	7
Rd/pB1000-20	170595	<i>dcuB</i>	Pseudogen. Similar al transportador anaerobico C4-dicarboxilato	Pseudogen	-	C	Y	1731	-	-	0	115	94	17
	401937	HI0380.2	ARNt Lisina	ARNt	-	A	R	98	-	-	0	207	150	30
	576724	<i>devB/zwf</i>	Pseudogen. Cataliza la formación de 6-fosfo-D-gluconato desde 6-fosfo-Dglucono-1,5-lactona / Cataliza la formación de D-glucono-1,5-lactona 6-fosfato desde D-glucosa 6-	Pseudogen / Proteína codificante	- / GF	A	R	-	-651/+167	-	0	35	11	12

			fosfato from 6-phospho-D-glucono- 1,5-lactone											
	677157	HI0635	Proteína de unión a la hemoglobina	Proteína codificante	M1	T	Y	3159, 1052	-	Ile233Val	0,005742	10	3	6
	1028637	<i>accB/accC</i>	Subunidad de la proteína Acetil-CoA carboxilasa biotina / Subunidad carboxilasa del Acetil-CoA carboxilasa biotina	Proteína codificante / Proteína codificante	M2/ M2	C	S	-	+30/-141	-	0,054625	10	6	2
	1037048	<i>pmrA</i> /HI0979	Metiltransferasas de la proteína L11 del ribosoma / Proteína hipotética. Los miembros de esta familia catalizan la reducción del enlace doble 5,6 de un residuo uridina en el ARNt	Proteína codificante/ Proteína codificante	GF, CP2, IS2, M2, M8 / GF, M1, M2, M3, M4	A	W	-	+1671/-73	-	0,085292	16	3	12
	1289434	<i>lctP/cmK</i>	Peremeasa L-lactato / Cataliza la formación de (d) CDP del ATP y (d)CMP	Proteína codificante / Proteína codificante	M7 / M4	G	T	-	-1850/-22	-	0	92	3	58
	1394221	HI1317	Proteína hipotética. Superfamilia de la epimerasa de aldosa. Cataliza la interconversión de los anómeros α y β de las hexosas como la glucosa y la galactosa	Proteína codificante	M1	C	S	816, 271	-	NO	0,011125	13	2	10
	1449977	HI1364	Regulador transcripcional de la familia de LysR	Proteína codificante	IS2	T	A	867, 288	-	Stop288Leu*	0	50	0	42

Detalles de las mutaciones puntuales obtenidas de la secuenciación masiva comparadas con el genoma de la cepa Rd KW20 (número de acceso: NC_000907). Las posiciones de los SNPs están referidas al genoma de la Rd KW20. Los nombres de los genes en los que se han encontrado las

mutaciones están indicados; las mutaciones en las regiones intergénicas tienen muestran los dos genes adyacentes (ejemplo *lctP/cmk*). ^c Las funciones general de los genes en los que las mutaciones se han descrito también están indicadas. El nucleótido original se refiere al nucleótido *wild type*, mientras que el nucleótido evolucionado se refiere el nuevo alelo encontrado. Para las mutaciones en genes, la longitud del gene tanto en nucleótidos como en aminoácidos está indicada. Para las mutaciones intergénicas, aparece el número de nucleótidos relativo hasta el comienzo del gen adyacente, dónde + indica una distancia relativa al codón *stop* de un gen, y – indica la posición del comienzo del codón *start* del gen vecino

^a Grupo de ortólogos (GO). No determinado (ND), Función General (GF), Función desconocida (FU). Procesos celulares (CP): Mecanismos de transducción de señales (CP1), Mecanismos de defensa (CP2), Biogénesis de la membrana celular o de la pared celular (CP3) y modificaciones post-transcripcionales, reciclaje de proteínas y chaperonas (CP4); Información, almacenamiento (IS): Replicación, recombinación y reparación (IS1) y transcripción (IS2); Metabolismo (M): Transporte y metabolismo de carbohidratos (M1), Transporte y metabolismo de aminoácidos (M2), transporte y metabolismo de coenzimas (M3), Transporte y metabolismo de nucleótidos (M4), Transporte y metabolismo de iones inorgánicos (M5), transporte y biosíntesis de metabolitos secundarios (M6), Producción y conversión de energía (M7), y metabolismo y transporte de lípidos (M8)

^b p-valor del SNP

^c Número de *reads* que cubren esa posición.

^d Número de *reads* del alelo de referencia (no mutado)

^e Número de *reads* del alelo más abundante en la posición

* El codon STOP mutado (TAA) se convierte en un codón de leucina (TTA). El tamaño del gen se ve aumentado en 55 nucleótidos hasta el siguiente codón STOP (TAA)

4.2. Una mutación puntual encontrada en el plásmido pB1000 en la naturaleza produce un aumento reversible de la resistencia a antibióticos

4.2.1. Resumen

Los plásmidos ColE1 son replicones de pequeño tamaño, movilizables, que juegan un papel importante en la diseminación de resistencia a antibióticos en Pasteurellaceae. En este estudio, describimos como una mutación puntual (SNP) en el origen del replicación del plásmido tipo ColE1 pB1000, encontrado en una *P. multocida*, genera dos variantes independientes del plásmido capaces de coexistir simultáneamente en la célula. Utilizando la cepa *Hamophilus influenzae* Rd como modelo, combinamos tests de resistencia a antibióticos, PCR cuantitativa, ensayos de competición y evolución experimental para caracterizar las consecuencias de la coexistencia de las variantes de pB1000. Esta coexistencia produce un aumento del número de copias de plásmidos en el hospedador, produciendo un aumento de la resistencia a antibiótica y del coste biológico impuesto por el plásmido. Utilizando evolución experimental, mostramos como en presencia de ampicilina, la bacteria mantiene ambas variantes durante 300 generaciones, mientras que en ausencia, la bacteria es capaz de perder una de las variantes. Nuestros resultados revelan como una mutación sencilla en el origen de replicación del plásmido pB1000 da a la bacteria un mecanismo para incrementar el número de copias de pB1000 y consecuentemente el nivel de resistencia a ampicilina. Crucialmente este mecanismo puede ser revertido rápidamente para evitar el coste-extra producido por el aumento del número de copias en ausencia de antibióticos.

4.2.2. Introducción

pB1000 es un plásmido pequeño tipo ColE1 que porta la β -lactamasa *bla*_{ROB-1} y confiere alto nivel de resistencia a β -lactámicos. pB1000 ha sido descrito en múltiples patógenos de Pasteurellaceae, incluyendo *H. influenzae* (Lacatena and Cesareni 1981, San Millan, Escudero *et al.* 2007, San Millan, Escudero *et al.* 2009, San Millan, Garcia-Cobos *et al.* 2010, Tristram, Littlejohn *et al.* 2010, San Millan, Giufré *et al.* 2011, Moleres, Santos-López *et al.* 2015).

La replicación de los plásmidos ColE1 está bajo el control de un ARN pre-primer (ARNII) que está negativamente regulado por un ARN pequeño antisentido (ARNI)(Tomizawa, Ohmori *et al.* 1977) (Figura 14). Las mutaciones afectando estos ARNs codificados en el *oriV* de los plásmidos, alteran tanto el NCP como la compatibilidad de los plásmidos ColE1. Mutaciones puntuales pueden dar nuevos plásmidos “compatibles” que son capaces de coexistir en la célula, aumentando el número total de NCP (Tomizawa, Ohmori *et al.* 1977, Lacatena and Cesareni 1981). Estas mutaciones han sido ampliamente descritas *in vitro* (Camps 2010), pero hasta dónde sabemos, no existen ejemplos de estas mutaciones naturales en plásmidos ColE1 cohabitando que se diferencien solamente por un SNP.

En este trabajo analizamos un plásmido pB1000 heterocigótico diferenciados solamente por un SNP en el *oriV* aislado de una cepa de *P. multocida* que mostraba alto nivel de resistencia a ampicilina (San Millan, Escudero *et al.* 2009). Nosotros demostramos como este SNP crea una nueva variante del plásmido, que coexiste con el pB1000 original, aumentando el NCP y el nivel de resistencia a ampicilina. Utilizando evolución experimental, hemos demostrado que la coexistencia de los plásmidos se puede revertirá fácilmente, modulando el nivel de resistencia y la carga metabólica producida por pB1000.

4.2.3. Materiales y Métodos

Cepas bacterianas, condiciones de cultivos y test de susceptibilidad a antibióticos

Obtuvimos *P. multocida* BB1038 de un cerdo infectado mostrando alto nivel de resistencia a ampicilina y cefaclor (San Millan, Escudero *et al.* 2009). Mediante el análisis de los cromatogramas de ADN obtenidos de secuenciar los amplicones de PCRs de colonias aisladas (oligo *forward* AATTGGTTGGACAATAACGCA and oligo *reverse* GCACACCTGATAAGCGAGATT), encontramos dos variantes de pB1000 – C3880 y A3880- coexistiendo en todas las colonias secuenciadas de la población (número de acceso a GenBank: GU080069).

H. influenzae Rd KW20 (Rd) fue transformada mediante electroporación con ambas variantes obtenidas de *P. multocida* BB1038 según lo descrito previamente utilizando un Gene Pulser apparatus (Bio-Rad, USA) (San Millan, Escudero *et al.* 2009). Mediante selección aleatoria de colonias, amplificación por PCR, secuenciación y el subsiguiente análisis de los cromatogramas, aislamos cepas de Rd portando ambas variantes individualmente y conjuntamente.

H. influenzae fue cultivada en HTM (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., EEUU) y en agar chocolate PolyVitex (BioMérieux, Francia) a 37°C y 5% de CO₂. La susceptibilidad a los antibióticos fue determinada en HTM midiendo la MIC a ampicilina (provista por Sigma-Aldrich, Reino Unido) mediante microdilución siguiendo las guías del CLSI (CLSI 2007). Utilizamos *H. influenzae* ATCC 49247 y ATCC 49766 como controles. Los resultados son la media de tres experimentos independientes (con tres réplicas técnicas por experimento).

Determinación del Fitness

El coste biológico de pB1000 fue determinado mediante competición directa (Figura 5) entre *H. influenzae* Rd y *H. influenzae* Rd portando las variantes de pB1000 juntas o separadas (San Millan, Santos-Lopez *et al.* 2015). Crecimos las cepas durante 16 h a 37°C y 5% CO₂ en HTM, después, mezclamos 10⁶ UFC de cada cepa en 2 ml de HTM. Cultivamos la mezcla bacteriana a 37°C, 5% CO₂ y 125 revoluciones por minuto durante 24 h. Cada día transferimos 10⁶ UFC a 2ml de HTM (dilución 1:1000, *ca.* 10

generaciones) cada 24 h durante 6 días. Tomamos muestras en el tiempo 0 y cada 24 horas. Para cada muestra, plaquemos alícuotas en agar no selectiva, y tras replicar de entre 50 y 100 colonias en agar chocolate conteniendo 100 mg/L de ampicilina calculamos el índice de competición (IC). El IC es el ratio entre las UFCs de las bacterias resistentes y sensibles a cada momento del tiempo (cada 24 horas) dividido por el mismo ratio en el momento en el que se mezclan los dos cultivos (Bjorkman y Andersson 2000). El coeficiente de selección (s), estima las diferencias entre los *fitness* relativos de dos competidores durante el experimento de competición. s se calcula como la pendiente del modelo de regresión lineal $s = \ln(\text{IC})/t$, donde el tiempo (t) fue medido en generaciones bacterianas, calculadas como el \log_2 del factor de dilución (Lenski 1991). El *fitness* relativo (w) fue calculado con la siguiente fórmula: $w = 1 + s$. Los resultados son la media de 3-6 experimentos independientes.

Cuantificación del número de copias

Determinamos la media del NCP mediante qPCR básicamente como está descrito en San Millan, Santos-Lopez *et al.* 2015. Para determinar el NCP, realizamos tres extracciones de ADN independientes para cada cepa, y realizamos la qPCR por quintuplicado para cada extracción. Cada cepa creció en 2 ml de HTM fresco y extrajimos el ADN a una DO600 de 0,9 utilizando el QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Inc, Chatworth, EEUU). Cuantificamos el ADN utilizando un Nanodrop. Siguiendo las indicaciones de Providenti y colaboradores (Providenti, O'Brien *et al.* 2006), digerimos 1 μg de ADN de cada muestra con 20 unidades de PstI (TaKaRa, Japón) durante 2 horas a 37°C. Posteriormente inactivamos PstI durante 15 minutos a 60°C.

Realizamos las qPCRs utilizando el My iQ Single Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad laboratories) con el iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) a una concentración final de ADN de 10 pg/ μl . Desarrollamos qPCRs específicas para el plásmido pB1000 (oligo CCAATTCTGTTCATTCGGTAAC [*forward*] and CATAAGCAAAGCGTTCATCTG [*reverse*]; tamaño del amplicón, 195 pb. Para determinar la media de PCN, amplificamos el gen monocopia *ropB* (oligo AAGGCTATAAGAACCTGTTGAC [*forward*] and CGAGACGAAGCGGAAATC [*reverse*] tamaño del amplicón 199). La eficiencia de la reacción fue calculada para cada qPCR basándonos en la curva generada tras realizar qPCRs a 5 diluciones (con factor de dilución 1:8) del ADN molde en triplicado (rango de trabajo de ~ 0.2 ng/ μl a 50 fg/ μl).

Las reacciones con una eficiencia menor al 97% y mayor al 100%, con un r^2 menor de 0,998 fueron descartadas. Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: desnaturalización durante 10 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización durante 1' a 94°C, anillamiento durante 1 minuto a 52°C (*rpoB*) o 58,7°C (pB1000) y una extensión de 1' a 72°C. Para calcular el PCN utilizamos la siguiente fórmula descrita por San Millán y colaboradores (San Millan, Heilbron *et al.* 2014):

$$cn = \frac{(1 + E_c)^{Ctc}}{(1 + E_p)^{Ctp}} * \frac{S_c}{S_p}$$

Dónde *cn* es el número de copias del plásmido por cada cromosoma, *Sc* y *Sp* son los tamaños de los amplicones del cromosoma y del plásmido respectivamente, *Ec* y *Ep* son las eficiencias de las qPCRs relativas a uno del cromosoma y del plásmido, y *Ctc* y *Ctp* son los ciclos *threshold* de las qPCRs del cromosoma y del plásmido respectivamente.

Evolución experimental

Propagamos durante 300 generaciones (30 días) cinco poblaciones de *H. influenzae* Rd portando ambas variantes de pB1000 en heterozigosis (en un ratio aproximado de 45:55 variante C3880 vs. variante A3380) con un factor de dilución diario de 1:1000 (aproximadamente 10 generaciones por día) en HTM a 37°C y 5% CO₂ y 125 revoluciones por minuto. En paralelo, propagamos 5 réplicas con las mismas condiciones descritas arriba pero con concentraciones Sub-CMI de ampicilina (64mg/L). En los días 10, 20 y 30 (generaciones 100, 200 y 300) determinamos la proporción de las diferentes variantes de pB1000 como sigue: extrajimos los plásmidos de todas las poblaciones (QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAgen, USA); y secuenciamos completamente los replicones mediante Sanger, utilizando la extracción del plásmido como molde. Finalmente calculamos las frecuencias de las poblaciones del *pool* de ADN de la población analizando los cromatogramas con el software QSVanalyser (Carr, Robinson *et al.* 2009). Aparte del polimorfismo en la posición 3880, no encontramos más mutaciones a lo largo del experimento.

Análisis Estadístico

La comparación de los resultados entre dos y tres cepas fueron realizadas *two-tailed t-tests* y ANOVAs respectivamente. Para analizar la contribución de ambas variantes al NCP total (medidas por qPCR) durante la cohabitación, realizamos un *two-tailed t-test* comparando la suma del NCP de ambas variantes habitando la célula sola contra el NCP de ambas variantes cohabitando la misma célula. Las correlaciones mediante las variables NCP-*fitness* y NCP-CMI fueron determinadas utilizando la correlación *Pearson product-moment*; para realizar el análisis estadístico, comparamos todas las muestras de *fitness* y CMI con el mismo número de muestras de NCP elegidas aleatoriamente de todas las réplicas.

4.2.4. Resultados y discusión

Las variantes de pB1000 actúan como plásmidos independientes pB1000

Recientemente, hemos recuperado de un cerdo una cepa de *P. multocida* (BB1038) portando pB1000 y mostrando un excepcional nivel de resistencia a ampicilina y cefaclor (San Millan, Escudero *et al.* 2009). Decidimos realizar un análisis exhaustivo de la secuencia del plásmido de colonias independientes, y observamos la presencia de un SNP heterocigótico (C3880A) cerca del origen de replicación putativo *oriV* (Figura 26A). Para testar si la mutación podría ser responsable de la generación de plásmidos independientes coexistiendo, transformamos *H. influenzae* Rd KW20 (Rd) con una preparación de pB1000 obtenida de BB1038, y seleccionamos cepas portando ambas variantes individualmente o cohabitando. Medimos el NCP de los diferentes transformantes de *H. influenzae* mediante qPCR (San Millan, Escudero *et al.* 2009, San Millan, Santos-Lopez *et al.* 2015). La cepa portando ambos alelos llevaba 34,51 copias [Error Estándar de las Medias (SEM)= 4,26] mientras que el NCP de las variantes C3880 y A3880 solos en la bacteria fueron de 14,31 (SEM= 1,72) y 21,23 (SEM= 1,63) respectivamente (Figura 1B). El PCN varió significativamente entre las tres cepas (ANOVA $P= 0,029$; $F= 6,05$; $gl= 1,12$), y entre cada alelo individualmente (*two-tailed t-test* $P= 0,003$; $t= 2,04$; $gl= 28$). Los resultados sugerían que ambas variantes mantenían su número propio de copias cuando coexisten, dado que el NCP total en la cepa portando ambos alelos era la suma del NCP de ambos alelos cuando

habitaban la célula independientemente (*two-tailed t-test*; $P= 0,830$; $t= 2,04$; $gl= 28$; *Pearson's test* $r(13)= 0,942$; $P= 1,57 \times 10^{-7}$).

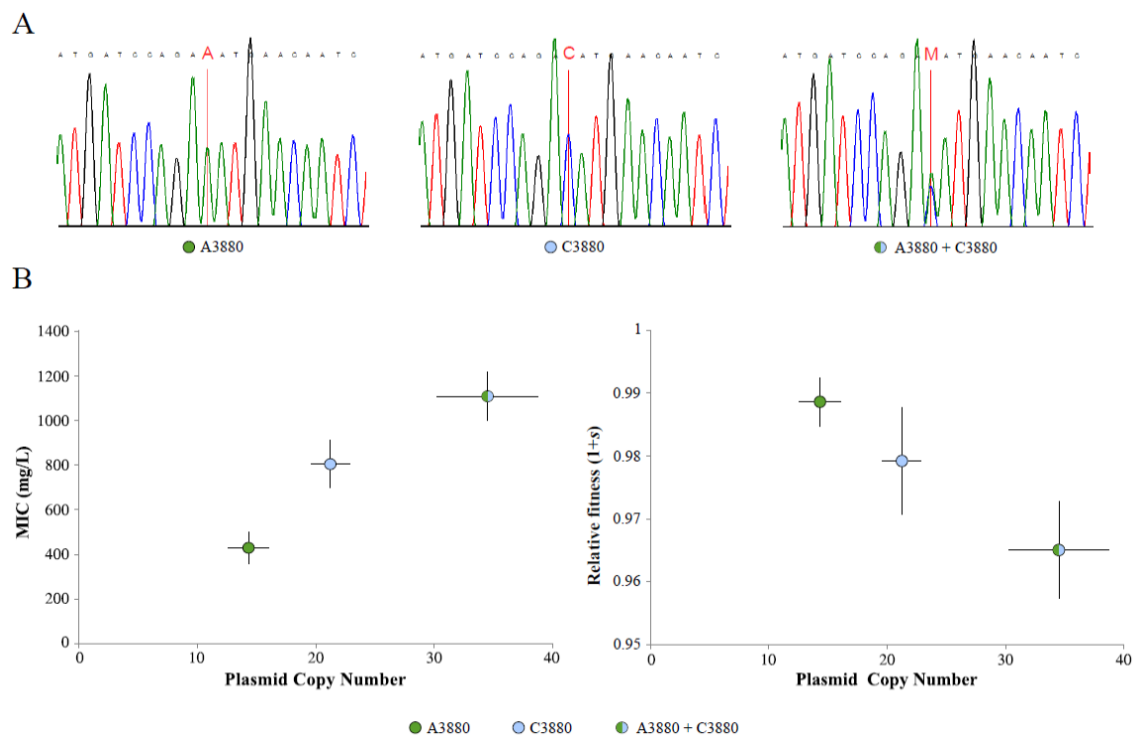


Figura 26. Efectos fenotípicos y genotípicos de un SNP natural heterozigótico en el *oriV* de pB1000.

Un SNP heterozigótico en el *oriV* de pB1000 produce un aumento en el NCP que provoca que se aumente el nivel de resistencia a ampicilina y la carga metabólica asociada al plásmido. (A) Los cromatogramas de las diferentes variantes. De izquierda a derecha: variante A3880, variante C3880 y variante A3880+C3880 en heterozigosis. Las substituciones están resaltadas con letras rojas en los cromatogramas. M denota la variante heterozigótica A y C. (B) Correlación entre el NCP y el nivel de resistencia (izquierda) y entre el NCP y el *fitness* relativo (derecha). Los puntos verde, azul, y azul/verde marcan las cepas portando las variantes A3880, C3880 y ambas en heterozigosis respectivamente. Las barras indican el SEM.

La coexistencia de los plásmidos aumenta el nivel de resistencia pero disminuye el crecimiento bacteriano en ausencia de antibióticos

Se ha demostrado que el NCP se correlaciona con la resistencia a antibióticos en el caso de β -lactamasas portadas por plásmidos (Martinez, Cercenado *et al.* 1987). Por tanto medimos el nivel de resistencia a ampicilina en las diferentes construcciones mediante la determinación de la MIC (CLSI 2007). La MIC mostrada por la variante C3880 fue de 424 mg/L (SEM= 75) y la MIC conferida por el alelo A3880 fue de 836 mg/L (SEM= 133). La CMI mostrada por las variantes coexistiendo fue de 1109 (SEM= 112). Los niveles de resistencia variaron entre las tres cepas (ANOVA $P= 0,005$; $F=$

10,66; $gl= 2, 23$), y entre las cepas portando ambas variantes individualmente (*two-tailed t-test* $P= 0,017$; $t= 2,13$; $gl= 15$). Además encontramos una correlación lineal entre el NCP y el nivel de resistencia (*Pearson's test* $r(25)= 0,853$; $P= 1,62 \times 10^{-8}$) (Figura 26B), que sugiere que el fenotipo de resistencia producido por ambos alelos fue la suma de las resistencias provocadas por cada alelo individualmente.

También observamos cómo el aumento en las copias de pB1000 provocó un incremento en el nivel de resistencia. Sin embargo, en ausencia de antibióticos, el aumento del NCP normalmente produce un incremento del coste biológico acaecido por los plásmidos (Harrison, Koufopanou *et al.* 2012, Baltrus 2013). Para analizar esta posibilidad, determinamos el coste biológico de las diferentes variantes solas o cohabitando, utilizando el coeficiente de selección s (San Millan, Santos-Lopez *et al.* 2015). El *fitness* relativo (w) de la cepa portando ambas variantes fue de 0,966 (SEM= 0,007). El w de la cepa portando las variantes C3880 y A3880 fue 0,989 (SEM= 0,003) y 0,980 (SEM= 0,008) respectivamente. Encontramos una correlación significativa entre el NCP y el coste biológico producido por los plásmidos (*Pearson's test* $r(7)= 0,879$; $P= 0,001$) (Figura 26B).

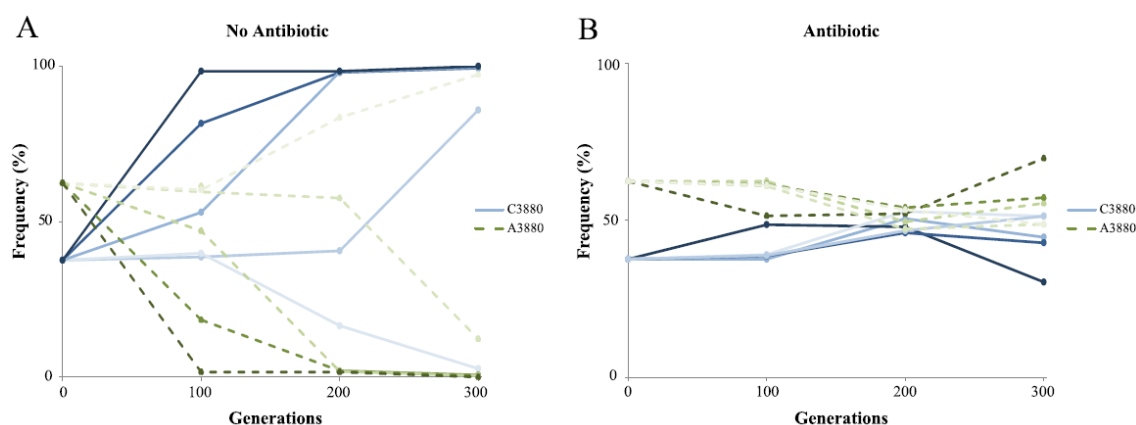


Figura 27. Frecuencia de las variantes de los plásmidos en las poblaciones durante la evolución experimental.

La frecuencia de las variantes de pB1000 en las diferentes poblaciones estimadas durante la evolución experimental en ausencia (A) o presencia (B) de presión antibiótica. La frecuencia de cada alelo está representada, por tanto, cuando uno de los alelos llega a la fijación (100% de frecuencia) el otro alelo desaparece de la población (0% de frecuencia). Las cinco poblaciones en cada tratamiento inicialmente llevaban ambos plásmidos y están representadas por cinco diferentes tonos de líneas azules (variante C3880) y líneas punteadas verdes (Variantes A388). Las líneas continuas o puntuadas representan las frecuencias de las variantes C3880 y A3880 en cada población respectivamente. En presencia de ampicilina todas las poblaciones mantuvieron ambas variantes mientras que en ausencia de ampicilina 4 poblaciones de 5 perdieron completamente una de las variantes.

Reversión rápida a genotipo de un solo plásmido en ausencia de ampicilina

Nuestros resultados demostraron que un aumento del NCP produce un incremento del coste biológico en ausencia de ampicilina, pero también potencia la CMI a ampicilina, produciendo una ventaja potencial en presencia de este antibiótico. Por tanto, uno puede esperar que ambas variantes del plásmido sean mantenidas en presencia de ampicilina. En ausencia de ampicilina, por otro lado, predecimos que la relativa frecuencia de pérdida aleatoria de los plásmidos durante la división celular que afecta a los plásmidos pequeños multicopia (Ayala-Sanmartin y Gomez-Eichelmann 1989), purgará de la población una de las dos variantes del plásmido. Para testar esta hipótesis, propagamos 5 poblaciones de *H. influenzae* portando ambos plásmidos durante 300 generaciones con y sin presión a de ampicilina (64 mg/L; *ca.* 1/6 de la MIC de la cepa portando la variante que confiere el menor nivel de resistencia). Tras 0, 100, 200 y 300 generaciones, testamos la presencia de las diferentes variantes de los plásmidos en las poblaciones propagadas (Figura 27), así como la CMI y el PCN (Figura 28).

En las poblaciones evolucionadas sin presión antibiótica, 4 de las 5 poblaciones

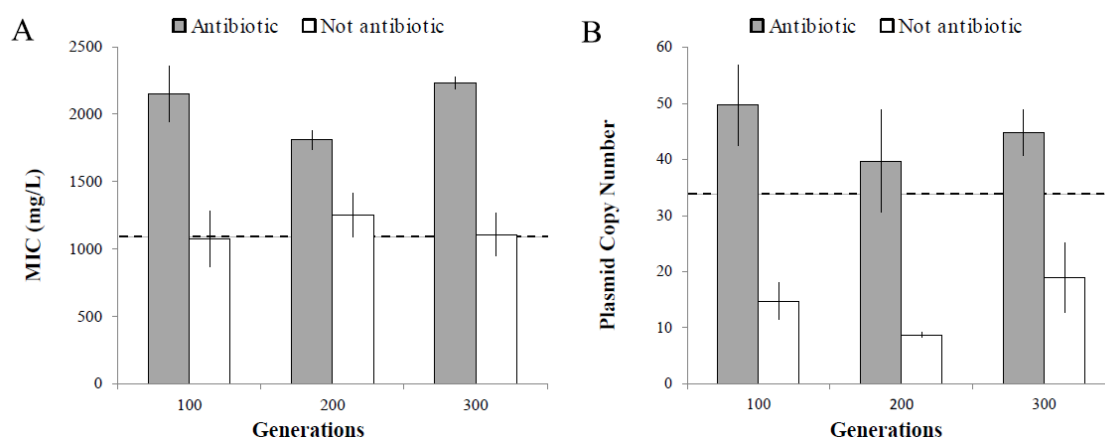


Figura 28. Nivel de resistencia a ampicilina y número de copias durante la evolución experimental .

La presencia de ampicilina está asociada con un aumento del NCP y del nivel de resistencia a ampicilina en las poblaciones evolucionadas. La representación gráfica del nivel de resistencia (mg/L) (A) y NCP (B) durante la evolución experimental de *H. influenzae* Rd portando ambas variantes de pb1000 en presencia (rectángulos grises) y ausencia (rectángulos blancos) de ampicilina. Las barras representan el SEM. Las líneas negras punteadas representan el nivel de resistencia (A) y el NCP (B) de la cepa parental *H. influenzae* Rd KW20 portando ambas variantes de pb1000 al principio del experimento. Las poblaciones evolucionadas en ausencia de ampicilina mostraron una disminución del número de copias comparado con la cepa parental (*two-tailed t-test*; $P < 0.005$; $t = 2.04$; $gl = 28$), pero no mostraron disminución en el nivel de resistencia comprado con la cepa ancestral (*two-tailed t-test*; $P = 0.608$; $t = 2.07$; $gl = 28$). Este efecto se deba probablemente al aumento del *fitness* relativo de las poblaciones evolucionadas comparadas con la cepa parental, que como hemos demostrado antes, produce aumentos moderados en el nivel de resistencia a ampicilina (San Millan, Santos-Lopez *et al.* 2015).

perdieron completamente una de las variantes de pB1000 después de las 300 generaciones: 3 de ellas perdieron el alelo más costoso (A3380) y una de las poblaciones perdió la variante C3880 (Figura 27A). Por otro lado, en las poblaciones evolucionadas en presencia de ampicilina, todas las poblaciones portaron ambos alelos durante las generaciones 100, 200 y 300, lo que apoya la hipótesis de los efectos positivos en el *fitness* asociados con el aumento del NCP en presencia de ampicilina (Figura 27B).

Como esperábamos por trabajos previos, encontramos diferencias en NCP y en el nivel de resistencia a ampicilina entre las poblaciones propagadas en presencia y en ausencia de ampicilina (Figura 28). Las poblaciones evolucionadas bajo presión de ampicilina, presentaron tanto un NCP mayor como un nivel de resistencia mayor que aquellas propagadas sin presión antibiótica en las generaciones 100, 200 y 300.

4.2.5. Conclusiones

Los resultados de este experimento llevan a una conclusión muy interesante: el aumento de la resistencia mediada por la aparición de un SNP en pB1000 se puede revertir sin mutaciones. Esta reversión se produce por pérdida del plácido, que ocurre a una frecuencia más alta que las mutaciones potenciales que puedan revertir al plásmido a su genotipo original o compensando el coste biológico del replicón. De hecho, la tasa teórica de pérdida del plásmido por cada generación para los alelos del plásmido es 10^2 - 10^4 veces más alta que la tasa de mutación por generación en *H. influenzae* (Ayala-Sanmartin and Gomez-Eichelmann 1989, Power, Sweetman *et al.* 2009, San Millan, Peña-Miller *et al.* 2014). Por tanto, esta es una estrategia altamente plástica para modular la resistencia mediada por plásmido, y creemos que es más común en la naturaleza de lo que se había creído previamente.

4.3. La evolución compensatoria facilita la coexistencia de plásmidos multicopia

4.3.2. Resumen

La coexistencia plásmidos ColE1 es un fenómeno muy común en la naturaleza. Sin embargo no conocemos bien el comportamiento de estos plásmidos cuando coexisten, y las fuerzas que promueven este genotipo. En este trabajo, hemos analizado varios plásmidos tipo ColE1 cohabitando: pB1000, pB1005 y pB1005 en *Haemophilus influenzae* RdKW20 en todas las combinaciones posibles. Cuando transformamos estos plásmidos en el hospedador sin evolucionar, cada plásmido produce el mismo perfil de resistencia, tiene el mismo número de copias y produce el mismo coste biológico cohabitando que habitando la célula por separado. Por tanto no hay ventaja evolutiva asociada a la coexistencia (epistasis positiva) que pueda explicar las asociaciones plasmídicas. Utilizando evolución experimental demostramos que *H. influenzae* Rd era capaz de compensar el coste biológico producido por uno de estos plásmidos tipo ColE1. Una vez que la bacteria ha compensado el coste del primer plásmido, la adquisición de nuevos replicones no tiene ningún impacto en el crecimiento bacteriano. Nosotros discutimos si las adaptaciones compensatorias son las responsables de la coexistencia los plásmidos tipo ColE1.

4.3.2. Introduction

La resistencia a antibióticos es un problema serio en la sanidad humana y animal. Los plásmidos juegan un papel esencial en la diseminación de resistencias. En los últimos años, numerosos trabajos han descrito la importancia de los plásmidos pequeños tipo ColE1 en la diseminación y como reservorio de genes de resistencia (Kehrenberg y Schwarz 2000, Cao, Lambert *et al.* 2002, Hanglord, Stang *et al.* 2009, San Millan, Escudero *et al.* 2009, San Millan, Escudero *et al.* 2009, Zioga, Whichard *et al.* 2009, Chen, Strobaugh *et al.* 2010, Pallecchi, Riccobono *et al.* 2010, San Millan, Garcia-Cobos *et al.* 2010, Tristram, Littlejohn *et al.* 2010, Pallecchi, Riccobono *et al.* 2011, Moleres, Santos-López *et al.* 2015). Los plásmidos tipo ColE1 replican como el plásmido ColE1, mediante dos ARNs (Tomizawa, Ohmori *et al.* 1977). Mutaciones puntuales en el *oriV* permite a diferentes plásmidos ColE1 cohabitar establemente dentro de una misma célula (Lacatena and Cesareni 1981). Si los plásmidos portan determinantes de resistencia a antibióticos, esta cohabitación provocará la adquisición de multirresistencia por parte de la bacteria (San Millan, Escudero *et al.* 2009).

Sin embargo, generalmente la adquisición de los plásmidos supone una disminución del *fitness* bacteriano (Baltrus 2013). El coste biológico de estos plásmidos pequeños es alto comparado con aquellos plásmidos grandes que portan la maquinaria necesaria para la conjugación (San Millan, Heilbron *et al.* 2014). Por tanto es razonable asumir que la acumulación de varios plásmidos pequeños reducirá el *fitness* bacteriano tanto, que la bacteria portando varios plásmidos será eliminada de las poblaciones (sin presión antibiótica) dado que las segregantes sin plásmidos tendrán un mejor *fitness*. A pesar de ello, la cohabitación de los plásmidos ColE1 es un proceso muy común en la naturaleza (San Millan, Escudero *et al.* 2009, Lanza, de Toro *et al.* 2014, Moleres, Santos-López *et al.* 2015, Stoesser, Sheppard *et al.* 2016) (Apartado 2.6 de la tesis, Tablas 3 y 4). En este estudio proponemos dos hipótesis que podrían explicar el fenómeno de la cohabitación: i) existen interacciones epistáticas positivas entre los plásmidos que reducen el coste biológico causado por un solo plásmido (San Millan, Heilbron *et al.* 2014) o ii) una vez que la bacteria ha compensado el coste biológico de un solo plásmido, (San Millan, Santos-Lopez *et al.* 2015, San Millan, Toll-Riera *et al.* 2015), la adquisición de nuevos replicones no compromete el *fitness* bacteriano.

En este trabajo hemos demostrado que una vez que se compensa el coste biológico de un plásmido tipo ColE1, la adquisición de más plásmidos de esta familia, no supone un coste biológico para la bacteria, por tanto hemos identificado una fuerza motriz para la cohabitación de plásmidos.

4.3.3. Materiales y Métodos

Condiciones de cultivo, cepas bacterianas y determinación del nivel de resistencia

Todas las cepas y los plásmidos utilizados en este estudio están descritos en las Tablas 8, 9 y 12. *H. influenzae* fue electroporada con pB1000, pB1005 y/o pB1006 obtenidos de *P. multocida* BB1044 (San Millan, Escudero *et al.* 2009) según lo descrito previamente (San Millan, Garcia-Cobos *et al.* 2010). *H. influenzae* fue cultivada en agar chocolate PolyViteX (BioMérieux, Francia) y en HTM (Wider, Francisco Soria Melguizo, España) con una agitación de 125 revoluciones por minuto y 37°C en condiciones microaerófilas (5% CO₂). La resistencia a antibióticos fue determinada mediante la estimación de la CMI a ampicilina, estreptomicina y tetraciclina (provistos por Sigma-Aldrich, Reino Unido), siguiendo los estándares del CLSI (CLSI 2007).

Tabla 8. Plásmidos utilizados en este estudio

Plásmido	Descripción y características	Referencia
Plásmidos		
pB1000	<i>mobA mobB mobC bla_{ROB-1}</i> ; ColE1	(San Millan, Escudero <i>et al.</i> 2009)
pB1005	<i>mobA mobB mobC strA</i> ; ColE1	(San Millan, Escudero <i>et al.</i> 2009)
pB1006	<i>mobA mobB mobC tet(O)</i> ; ColE1	(San Millan, Escudero <i>et al.</i> 2009)

Estimación del número de copias de plásmidos.

Determinamos el NCP medio por célula mediante qPCR tal y cómo describieron San Millán y Colaboradores (San Millan, Santos-Lopez *et al.* 2015). Para determinare el NCP realizamos tres extracciones de ADN para cada cepa, y realizamos 3 qPCRs por cada extracción. Para extraer el ADN, crecimos cada cepa en 2 ml de HTM fresco y a

una DO600 cercana a 0,9 extrajimos el ADN utilizando el kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Inc, Chatworth, EEUU). Cuantificamos la cantidad de ADN utilizando un nanodrop. Digerimos con la enzima PstI (TaKaRa) el ADN extraído (como está descrito en San Millán, Santos-Lopez *et al.* 2015), ya que resulta un mejor *template* para la reacción (Providenti, O'Brien *et al.* 2006). Para determinar el NCP medio de cada plásmido, amplificamos el gen monocopia *rpoB*.

Tabla 9. Cebadores utilizados en este estudio

Cebador	Secuencia (5'-3')	Amplicón	Eficiencia	T° de <i>melting</i>
TET(O) F	CCAGACAGCAGTGACATC	pB1006 (200 pb)	95,7-99,1%	54,6°C
TET(O) R	TCGGAATCTTCATTATCTGTAGT			
STRA F	TTGGTTTGTGCATAGATATTC	pB1005 (199 pb)	98,8%	55,1°C
STRA R	AATGATGAGCGATTTATTC			
ROB-1 F	CCAATTCTGTTCATTTCGGTAAC	pB1000 (195 pb)	95,8%	58,5°C
ROB-1 R	CATAAGCAAAGCGTTCATCTG			
RPOB F	GCAGACGAAGCGGAAATC	<i>rpoB</i> (192 pb)	95,7-99,8%	51,7°C
RPOB R	AAGGCTATAAGAACCTGTTGAAC			

La secuencia, el fragmento amplificado, la eficiencia de la qPCR, la temperatura de anillamiento de los cebadores están indicados.

Realizamos las qPCRs utilizando el My iQ Single Color Real-Time PCR Detetion System (Bio-Rad laboratories) con el iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) a una concentración final de 10 pg/ul. Estimamos la eficiencia mediante la obtención de una recta de regresión de 5 qPCRs de 5 diluciones (factor de dilución 1/8) de una muestra común. Las reacciones con un r^2 menor de 0.985 fueron descartadas. Todos los cebadores utilizados, así como las temperaturas de anillamiento y las eficiencias están descritas en la Tabla 9. La cuantificación del número de copias se hizo siguiendo lo descrito por San Millán (San Millan, Heilbron *et al.* 2014).

Mediciones del *fitness*

El *fitness* bacteriano fue determinado mediante competiciones directas entre la cepa *H. influenzae* Rd y *H. influenzae* Rd portando el (los) plásmido(s), en HTM en 3-5

experimentos independientes (San Millan, Santos-Lopez *et al.* 2015). Para más información ver Materiales y Métodos de los capítulos anteriores.

La epistasis entre los plásmidos fue determinada como describieron Hall y colaboradores (Hall and MacLean 2011). La Epistas (ε) puede ser calculada como $\varepsilon = -\frac{w_{(\text{plásmido A})}w_{(\text{plásmido B})}}{w_{(\text{plásmido A})} + w_{(\text{plásmido B})} - w_{(\text{plásmido A}; \text{plásmido B})}}$, donde $w_{(\text{plásmido A})}$ or $w_{(\text{plásmido B})}$ es el *fitness* relativo de la cepa portando 1 o 2 plásmidos comparado con el *fitness* de la cepa sin plásmidos y $w_{(\text{plásmido A}; \text{plásmido B})}$ es el *fitness* relativo de la cepa portando ambos plásmidos al mismo tiempo comparado con la cepa parental sin replicones. Después el error de propagación (σ_ε) se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\sigma_\varepsilon = \sqrt{\sigma^2_{(\text{plásmido A}; \text{plásmido B})} + \sigma^2_{(\text{plásmido A})}w^2_{(\text{plásmido B})} + \sigma^2_{(\text{plásmido B})}w^2_{(\text{plásmido A})}}$$

Si el valor de la epistasis está dentro del error de propagación, entonces no hay interacciones epistáticas entre los replicones; si por otro lado el valor está fuera del rango del error de propagación, uno puede asumir que hay interacciones epistáticas entre los dos plásmidos. Ambas fórmulas fueron ajustadas para estimar la epistasis entre los tres plásmidos.

Análisis *in silico*

Analizamos todos los genomas de Pasteurellaceae y Enterobacteriaceae disponibles en GenBank en Noviembre de 2015. Solamente los genomas con el estado de “Complete” fueron incluidos en el análisis.

4.3.4. Resultados y Discusión

La cohabitación de los plásmidos ColE1 en la naturaleza

Combinamos trabajos *in silico* y experimentales para analizar la prevalencia de la cohabitación en la naturaleza. Primero, analizamos una colección de Pasteurellaceae portando pB1000 y después analizamos todos los genomas de Enterobacteriaceae y Pasteurellaceae depositados en las bases de datos:

-Pasteurellaceae

En Pasteurellaceae pB1000 es el plásmido tipo ColE1 más distribuido mundialmente (San Millan, Escudero *et al.* 2007, San Millan, Escudero *et al.* 2009, San Millan 2010, Tristram, Littlejohn *et al.* 2010, San Millan, Giufre *et al.* 2011, Moleres, Santos-López *et al.* 2015). Tras re-analizar la primera cepa en la que encontramos pB1000 (un aislado de *H. parasuis*) (San Millan, Escudero *et al.* 2007), hemos encontrado un segundo plásmido, el plásmido pB1006 (que codifica el gen *tet* (O) de resistencia a tetraciclina) previamente descrito en *P. multocida* (San Millan, Escudero *et al.* 2009). Además un aislado de *P. aerogenes* BB1084, fue recuperado mostrando alto nivel de resistencia a ampicilina y estreptomicina. En esta cepa, pB1000 estaba acompañado por el plásmido pIG1 (Wright, Strugnell *et al.* 1997). Finalmente, hemos encontrado varios plásmidos ColE1 en Pasteurellaceae en el único genoma secuenciado que porta plásmidos ColE1 en esta familia: la cepa de *A. pleuropneumoniae* AP76. Esta cepa porta 3 plásmidos tipo ColE1: pB1002, (APP7_A, número de acceso CP001904), pB1005 (APP7_B, número de acceso CP001903) y el plásmido crípico tipo ColE1 APP7_C (Número de acceso CP001902)

-Enterobacteriaceae

Después, hemos analizado detalladamente las bases de datos examinando la familia Enterobacteriaceae, donde los plásmidos tipo ColE1 fueron descubiertos por primera vez. Hay 631 plásmidos descritos en GenBank a lo largo de 490 genomas completos. De ellos 16% del total (100 plásmidos) pertenecen a la superfamilia ColE1. Solamente un plásmido tipo ColE1 aparece habitando una célula solo, mientras que el resto de los replicones (99%) cohabitan con más plásmidos. Entre los plásmidos tipo ColE1, vemos que el 45% de los plásmidos descritos cohabitan con al menos otro plásmido tipo ColE1.

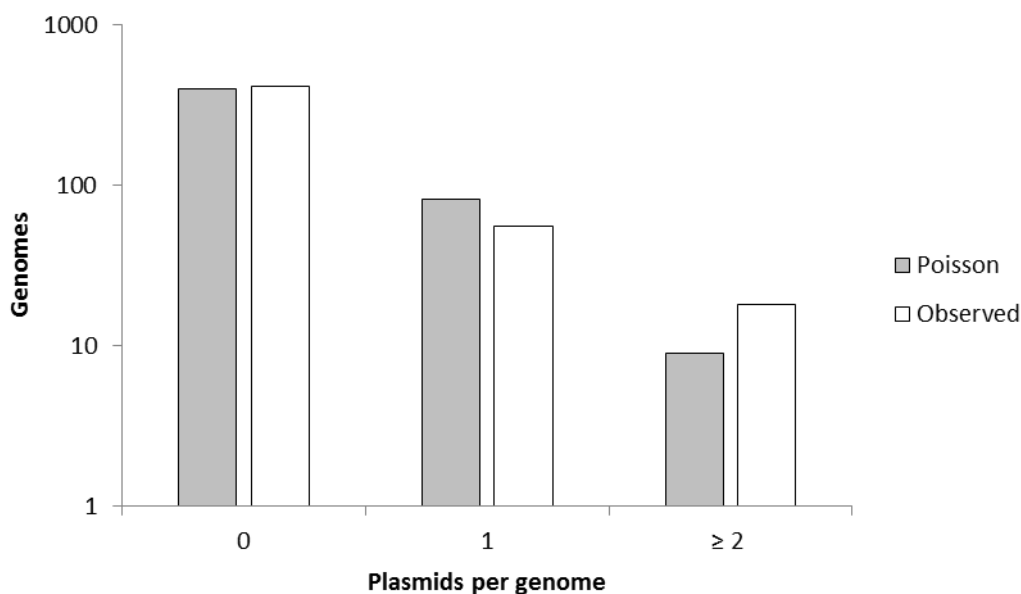


Figure 29. Distribución del número de plásmidos ColE1 por genoma.

Las barras grises representan el número de genomas esperado portando desde cero a \geq plásmidos siguiendo la distribución Poisson (utilizando la media de plásmido por cada cepa observado en los 490 genomas bacterianos analizados). Las barras blancas representan la frecuencia observada de los genomas portando desde cero a \geq plásmidos en los genomas analizados.

Hemos analizado la distribución de todos los plásmidos tipo ColE1 descritos en los genomas de Enterobacteriaceae. Tal y como describieron San Millan y colaboradores (San Millan, Heilbron *et al.* 2014), si los plásmidos están distribuidos al azar entre los genomas, la dispersión de los plásmidos seguirá una distribución Poisson. Si existe algún factor influenciando la distribución de los plásmidos como pueda ser la conjugación, la epistasis o la selección, el ratio observado de plásmidos por genoma sufrirá una desviación significativa de la distribución Poisson. Hemos encontrado una distribución significativamente diferente al patrón entre las distribuciones esperadas y observadas entre genomas portando 0 plásmidos, 1 plásmido o 2 o más plásmidos ColE1: (χ^2 test, $P < 0,001$) (Figura 29). Las cepas observadas sin plásmidos son menos común que lo que cabría esperar. Los genomas portando solamente un replicón están menos representados de lo que cabría esperar en una distribución normal, y hemos encontrado una sobre-representación de genomas portando varios plásmidos tipo ColE1.

Nuestros resultados muestran que la coexistencia de plásmidos tipo-ColE1 es un evento más frecuente en la naturaleza de lo que cabría esperar.

El coste biológico de los plásmidos ColE1 tiene un efecto aditivo

Los segregantes sin plásmidos tienen mejor *fitness* que las bacterias portando los plásmidos [ver revisión (Baltrus 2013)]. Por tanto, parece razonable asumir que las bacterias portando dos (o tres) plásmidos tendrán pero *fitness* que las bacterias portando solamente un replicón. Sin embargo, Morton y colaboradores (Morton, Platt et al. 2014) y San Millan y colaboradores (San Millan, Heilbron et al. 2014), han demostrado que la presencia de un plásmido puede favorecer la presencia de un segundo, es decir, cuando un hospedador porta un plásmido, la adquisición de un segundo (o tercer) plásmido en el hospedador no supondrá ningún coste biológico adicional debido a las interacciones epistáticas producidas entre los plásmidos.

Para determinar si las interacciones epistáticas pueden explicar la coexistencia de los plásmidos ColE1, transformamos *H. influenzae* Rd KW20 (Rd) con los plásmidos pB1000, pB1005 y pB1006 aislados de una muestra clínica de *P. multocida* BB1044 (San Millan, Escudero et al. 2009), obteniendo un modelo de las siete posibles combinaciones del hospedador portando uno, dos o tres diferentes plásmidos tipo ColE1 (Tabla 10). Los tres plásmidos están compuestos por una región variable en la que codifican determinantes de resistencia *-bla_{ROB-1}* en pB1000, *strA* en pB1005 y *tet(O)* en pB1006 (Tabla 9)-; y por una región constante en la que se encuentran los *oriVs*.

Tabla 10. Cepas utilizadas para analizar los efectos epistáticos ente los ColE1

Cepa	Descripción y Características ^a	Referencia
Cepa		
<i>Haemophilus influenzae</i>		
Rd	Tet ^S , Str ^S , Amp ^S cepa receptora de la electroporación	NC_000907
Rd0	Rd no evolucionada electroporada con pB1000	Este trabajo
Rd6	Rd no evolucionada electroporada con pB1006	Este trabajo
Rd5	Rd no evolucionada electroporada con pB1005	Este trabajo
Rd65	Rd no evolucionada electroporada con pB1006 and pB1005	Este trabajo
Rd60	Rd no evolucionada electroporada con pB1006 and pB1000	Este trabajo
Rd50	Rd no evolucionada electroporada con pB1005 and pB1000	Este trabajo
Rd650	Rd no evolucionada electroporada con pB1000, pB1005, pB1006	Este trabajo

^a Tet, tetraciclina; Str, estreptomicina y Amp, ampicilina; “S”, sensible.

Los tres *oriVs* de estos plásmidos son altamente similares en nucleótidos comparados con el único *oriV* descrito en Pasteurellaceae: (Dixon, Albritton *et al.* 1994): 89,43%, 99,39% y 91,01% de conservación para pB1000, pB1005 y pB1006 respectivamente.

Hemos estudiado tres diferentes aspectos en todas las construcciones: NCP, nivel de resistencia y coste biológico producido por los replicones. Para validar el modelo de *H. influenzae* portando los diferentes plásmidos ColE1, hemos analizado la estabilidad de las 7 construcciones. Todos los plásmidos en las 7 combinaciones presentaron un 100% de estabilidad en *H. influenzae* Rd después de 200 generaciones.

Tabla 11. Número de copias, *fitness* y susceptibilidad a antibióticos de las cepas utilizadas en este estudio

Cepa	NCP	<i>Fitness</i> Relativo (SEM) ^a	CMI(mg/L) ^b		
			Tet	Str	Amp
Rd	0	1	2	8	0,25
Rd0	10,53 ± 1,112	0,979 (± 0,012)	16	8	0,25
Rd6	20,45 ± 2,59	0,950 (± 0,013)	2	1024	0,25
Rd5	25,02 ± 1,92	0,964 (± 0,002)	2	8	512
Rd65	28,17 ± 2,37	0,921 (± 0,017)	16	1024	0,25
Rd60	33,96 ± 3,01	0,909 (± 0,003)	16	8	512
Rd50	43,22 ± 4,43	0,899 (± 0,009)	2	512	512
Rd650	53,58 ± 12,48	0,883 (± 0,016)	32	512	512

^a El *fitness* relativo está expresado comparado con la cepa parental Rd sin plásmidos

^b Tet, tetraciclina; Str, streptomycin and Amp, ampicilina.

Para estimare el coste biológico asociado a los replicones, hemo realizado competiciones directas entre la cepa *H. influenzae* Rd portando el/los plásmido/s, y la cepa parental *H. influenzae* Rd sin plásmidos en medio de cultivo sin presión antibiótica. El *fitness* (*w*) fue calculado utilizando el coeficiente de selección *s* relativo a *H. influenzae* Rd (San Millan, Garcia-Cobos *et al.* 2010). En nuestras competiciones, las diferencias observadas en el *fitness* se debieron al coste biológico asociado a los replicones en las correspondientes cepas (Tabla 11, Figura 30). Como era de esperar, la bacteria portando uno o más plásmidos tuvo peor *fitness* que la cepa ancestral Rd sin plásmidos (Tabla 11, Figura 30).

Para determinar si las interacciones epistáticas pueden explicar la cohabitación de los replicones tipo-ColE1, calculamos la epistasis tal y como describieron Hall y colaboradores (Hall and MacLean 2011). Tras calcular el error de propagación (Ver métodos) no encontramos interacciones epistáticas significativas (Tabla 11, Figura 30). El coste biológico de los plásmidos tiene un efecto multiplicativo en la célula: el w de una cepa portando dos o más plásmidos ColE1 (por ejemplo $w_{pB1000, pB1006} = 0,899$) es el múltiplo del *fitness* de las dos bacterias portando solamente un replicón ($w_{pB1000} \times w_{pB1006} = 0,946 \times 0,979 = 0,899$).

Los resultados por tanto afirman que las interacciones epistáticas entre plásmidos tipo ColE1 recientemente adquiridos no son la fuerza motriz de la coexistencia de los plásmidos tipo ColE1.

El coste biológico y la expresión fenotípica de los plásmidos ColE1 es proporcional al número de copias

Como se demostró previamente, el coste biológico de los plásmidos parece estar directamente relacionado con el número de copias (Martinez, Cercenado *et al.* 1987,

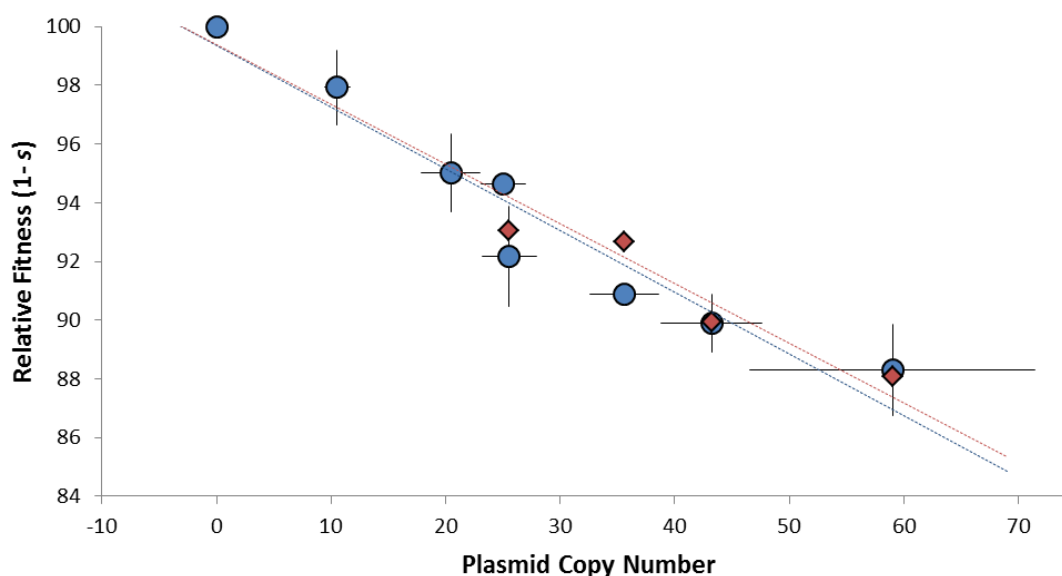


Figura 30. Fitness teórico y empírico de las 7 construcciones.

La relación entre el *fitness relativo* de la Rd no evolucionada transformada con diferentes plásmido (eje Y) calculado como $1+s$ y el NCP por cromosoma (eje X). De izquierda a derecha los círculos representan: Rd, Rd6, Rd5, Rd0, Rd65, Rd60, Rd50 y Rd650 (Tabla 10). El SEM está también indicado. Los cuadrados rojos denotan el *fitness* teórico calculado como está descrito en métodos. Las líneas punteadas azules y rojas, representan las líneas tendencias de los *fitness* empíricos y teóricos respectivamente.

Baltrus 2013). Por tanto analizamos el NCP vía qPCR utilizando el gen cromosómico monocopia *ropB* como referencia (San Millan, Santos-Lopez *et al.* 2015).

El NCP está mostrado en la Tabla 11, y las Figuras 30 y 31. Para los tres plásmidos el NCP no cambió independientemente de si convivían con otros plásmidos o habitaban la célula solos: pB1000 (ANOVA: $P= 0,95$; $F= 0,10$; $gl= 3, 16$), pB1005 (ANOVA: $P= 0,79$; $F= 0,33$; $gl= 3, 16$) y pB1006 (ANOVA: $P= 0,54$; $F= 0,75$; $gl= 3, 16$). En nuestro modelo, la replicación de los plásmidos ColE1 es independiente de la presencia de otros plásmidos ColE1 portados por célula a pesar de la gran similitud en la región conservada.

También analizamos la CMI a los tres antibióticos principales a los que confieren resistencia pB1000, pB1005 y pB1006 (ampicilina, tetraciclina y estreptomicina). Del mismo modo que el NCP no se vio alterado por la coexistencia con otros replicones, el fenotipo de resistencia no se vio afectado por la cohabitación (Tabla 11). Tras analizar el NCP en correlación con el coste metabólico causado por los replicones, podemos afirmar que el coste biológico está directamente relacionado con el número de copias de los plásmidos (*Pearson's test* $r(19)= 0,90$; $P< 0,0001$) (Figura 30).

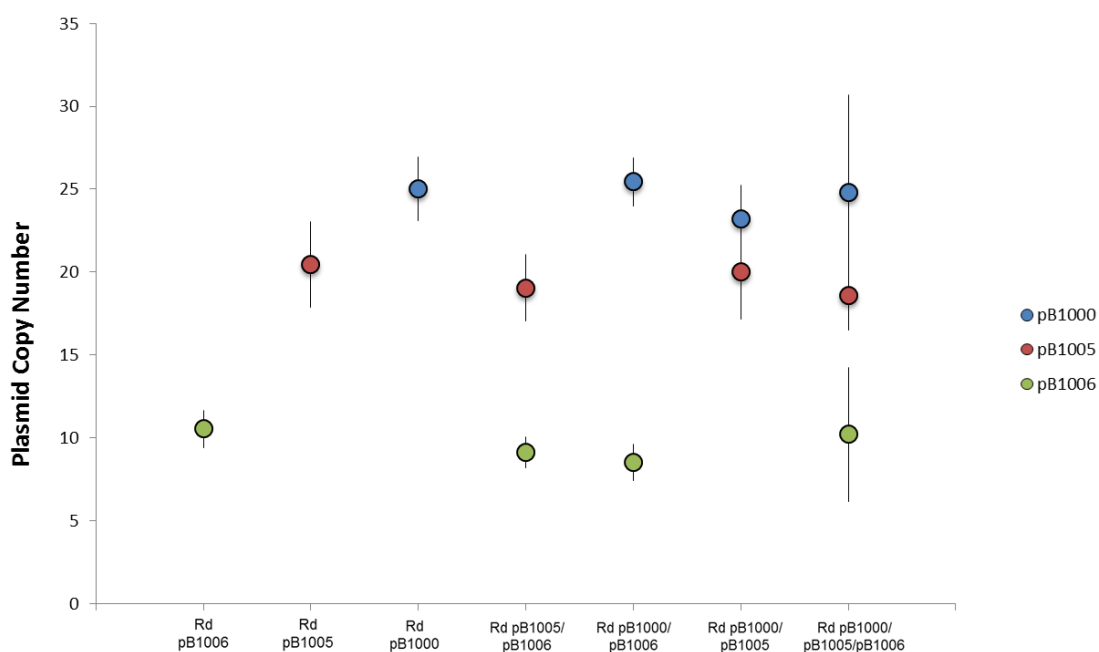


Figure 31. Número de copias de plásmido por cromosoma.

Número de copias de plásmido por cromosoma (eje Y) medido en las siete combinaciones (eje X). Los puntos verdes, azules y rojos representan a B1006, pB1005 y pB1000 respectivamente. Los SEM están indicados.

Por tanto, el coste biológico causado por los plásmidos ColE1 en una bacteria no adaptada a los replicones, se debe solamente al número total de copias de plásmidos presentes en la célula y no está relacionado con la expresión de los diferentes genes de resistencia. Nuestros resultados muestran que la regulación de la replicación y la expresión fenotípica de los genes codificados en los plásmidos no se ve afectado por la presencia de más ColE1 en la célula. Los plásmidos recientemente adquiridos actúan como unidades biológicas independientes en la célula.

La adaptación compensatoria favorece la adquisición de nuevos plásmidos pequeños.

A pesar del efecto multiplicativo del coste biológico, la cohabitación de los plásmidos ColE1 es un fenómeno muy común en la naturaleza. Como se ha demostrado, el coste biológico de los plásmidos ColE1 está directamente relacionado con el NCP. La maquinaria que regula el NCP está codificada en el *oriV* (el *oriV* de los tres plásmidos es virtualmente igual). Por tanto, es razonable pensar que si una bacteria es capaz de compensar el coste biológico de un replicon tipo ColE1, si adquiere uno nuevo, no habrá ningún efecto en el *fitness* bacteriano, dado que el motivo por el que los plásmidos cuestan ya está compensado.

Tabla 12. Cepas utilizadas en el experimento de adquisición-compensación

Cepa	Descripción y características ^a	Referencia
Cepa		
<i>Haemophilus influenzae</i>		
Rd	Tet ^S , Str ^S , Amp ^S cepa receptora de la electroporación	NC_000907
Rd0-10	Población evolucionada 100 generaciones desde la Rd	Este trabajo
Rd0-10/6	Clon seleccionado de Rd0-10 electroporado con pB1006	Este trabajo
Rd0-10/5	Clon seleccionado de Rd0-10 electroporado con pB1005	Este trabajo
Rd0-10/65	Clon seleccionado de Rd0-10 electroporado con pB1005 and pB1006	Este trabajo
Rd0-20	Población evolucionada 100 generaciones desde la Rd-10	Este trabajo
Rd0-20/6-10	Población evolucionada 100 generaciones desde la Rd0-10/6	Este trabajo
Rd0-20/6-10	Población evolucionada 100 generaciones desde la Rd0-10/6	Este trabajo
Rd0-20/5-10	Población evolucionada 100 generaciones desde la Rd0-10/5	Este trabajo

^a Tet, tetraciclina; Str, estreptomicina y Amp, ampicilina; “S”, sensible.

Para resolver esta cuestión, hemos propagado *H. influenzae* portando pB1000 hasta que su coste biológico ha sido compensado (San Millan, Santos-Lopez *et al.* 2015). Después hemos co-transformado diferentes combinaciones de los plásmidos y subsecuentemente hemos medido el coste biológico causado por los plásmidos adquiridos (Tabla 12, Figura 32).

Recientemente, hemos demostrado que *H. influenzae* Rd compensa las desventajas del *fitness* causadas por la adquisición de pB1000 en menos de 100 generaciones de adaptación plásmido-hospedador (San Millan, Santos-Lopez *et al.* 2015). En nuestro modelo, pB1000 era el plásmido más costoso, por tanto abría la ventana de selección más grande dónde las mutaciones compensatorias pueden aparecer (Gullberg, Albrecht *et al.* 2014). Por esta razón, hemos utilizado la cepa Rd portando pB1000 (Rd0) y la hemos propagado durante 200 generaciones. En los días 10 y 20 (Rd0-10 y Rd0-20), el *fitness* de la población había aumentado un $s = 0,131$ (SEM = 0,015) y $s = 0,204$ (SEM = 0,014) respectivamente comparado con la cepa parental *H. influenzae* Rd (Figura 32). Después seleccionamos 1 clon por cada población mostrando el mismo *fitness* que la población evolucionada y hemos transformado pB1006 y pB1005 separados y juntos. Tras analizar el coste biológico de los nuevos transformantes, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los *fitness* de la población Rd0-10 y los nuevos clones portando pB1005, pB1006 o ambos (ANOVA $P = 0,85$ $F = 0,16$ $gl = 2,6$), ni tampoco diferencias significativas entre Rd0-20 frente a las cepas transformadas con los plásmidos (solos o a la vez) (ANOVA $P = 0,92$ $F = 0,16$ $gl = 2,6$) (Figura 32).

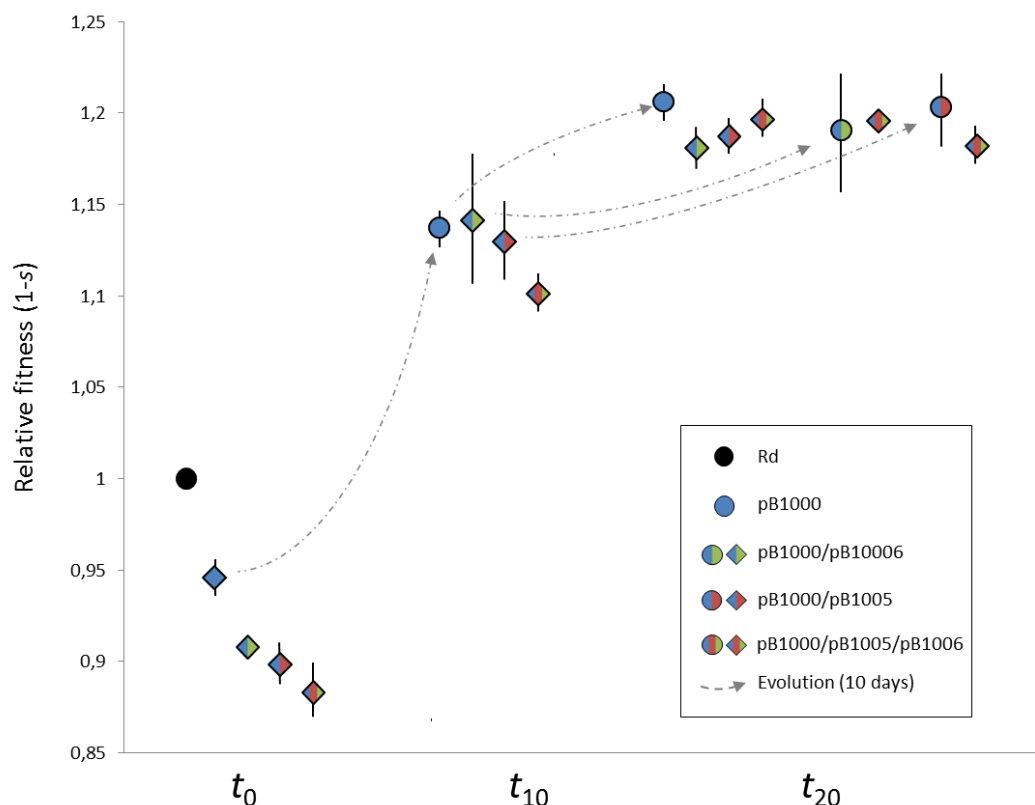


Figure 32. Adquisición de nuevos plásmidos en una bacteria portando un plásmido compensado

El *fitness* relativo (comparado con la Rd sin plásmidos ancestral) está indicado (eje Y) mediante cuadrados y puntos. Los cuadrados indican bacterias transformadas a partir de una bacteria evolucionada (puntos). La leyenda indica el significado de los colores. Las flechas punteadas indican 10 días de evolución. Los SEM están indicados.

Para comprobar si los resultados obtenidos se debían a la coevolución plásmido/hospedador, o simplemente una adaptación del hospedador al ambiente, propagamos la cepa Rd carente de plásmidos en las mismas condiciones durante 100 generaciones. Esta cepa evolucionada incrementó su *fitness* un $s = 0,215$ (SEM= 0,011) comparado con la cepa ancestral Rd. Seleccionamos un clon con el mismo *fitness* que la población y electroporamos pB1006, pB1005, pB1000 y pB1006/pB1005/pB100. En los clones resultantes los plásmidos mostraron el mismo coste biológico que tenían en la cepa no evolucionada: pB1006 (*two-tailed t-test* $P = 0,12$; $t = -1,92$; $gl = 4$), pB1005 (*two-tailed t-test* $P = 0,38$; $t = -0,97$; $gl = 4$), pB1000 (*two-tailed t-test* $P = 0,46$; $t = -0,80$; $gl = 4$) y pB1006/pB1005/pB1000 (*two-tailed t-test* $P = 0,72$; $t = -0,40$; $gl = 4$) (Figura 33).

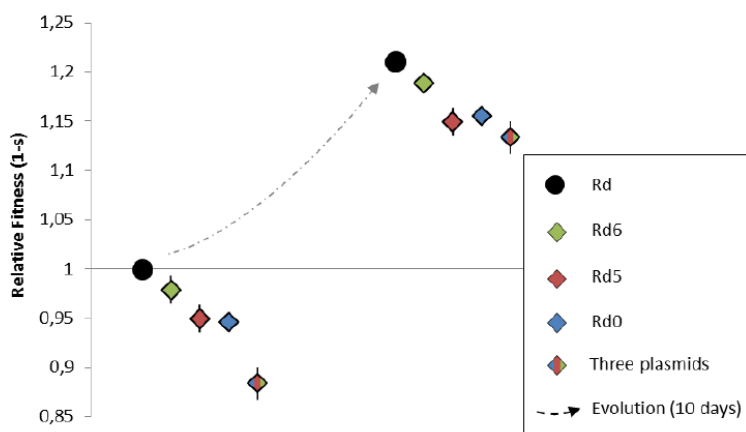


Figura 33. Adquisición de nuevos replicones en el hospedador evolucionado.

El *fitness* relativo (comparado con la Rd sin plásmidos ancestral) está indicado (eje Y) mediante cuadrados y puntos. Los cuadrados indican bacterias transformadas a partir de una bacteria evolucionada (puntos). La leyenda indica el significado de los colores. Las flechas punteadas indican 10 días de evolución. Los SEM están indicados

Estos resultados sugieren que la compensación del coste biológico del plásmido y no la adaptación al ambiente, es el factor clave de que la adquisición de nuevos plásmidos no suponga un coste adicional para la bacteria. (Figura 34).

La cohabitación del plásmido en un hospedador compensado no afecta la trayectoria evolutiva.

Finalmente, hemos propagado la cepa Rd0-10 transformada con pB1005 (Rd0-10/5) y con pB1006 (Rd0-10/6) (Tabla 12, Figura 32) durante 100 generaciones – obteniendo Rd0-20/5-10 y Rd0-20/6-10-. Las mejoras en el *fitness* de las poblaciones evolucionadas fueron Rd0-20/5-10 $s = 0,190$ (SEM = 0,031) y Rd0-20/6-10 $s = 0,203$ (SEM = 0,004). La adaptación plásmido/hospedador de Rd/pB1000 facilita la adquisición de nuevos replicones sin afectar al *fitness* bacteriano y además, las bacterias portando dos plásmidos son capaces de crecer al mismo nivel que la bacteria portando solamente uno. Finalmente seleccionamos 1 clon por población con un *fitness* representativo y electroporamos pB1005 en Rd0-20/6-10 y pB1006 en Rd0-20/5-10. No encontramos ninguna diferencia significativa en el *fitness* entre los nuevos clones (portando 3 replicones) y las cepas portando solamente dos plásmidos (Figura 32). Por tanto la adquisición de un tercer plásmido en una célula portando un plásmido compensado no afectó al crecimiento bacteriano. Nuestros resultados afirman que la adaptación compensatoria facilita el camino de la adquisición de múltiples plásmidos ColE1 (Figura 34).

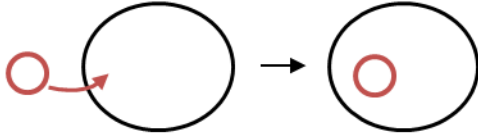
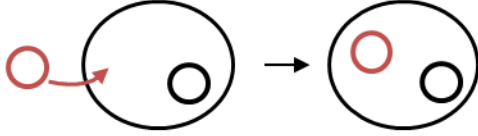
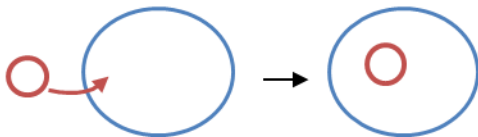
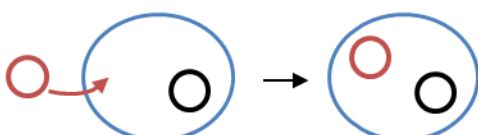
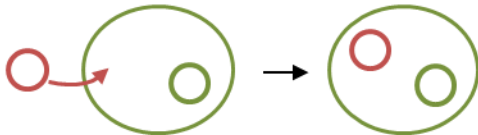
Acquisition of new plasmids	Fitness variation
Non-evolved bacteria	
	↓
	↓
Environmentally adapted bacteria	
	↓
	↓
Compensated plasmid by adaptation	
	=

Figura 34. Adquisición de nuevos plásmidos y el efecto en el *fitness* bacteriano

Los círculos rojos denotan el plásmido adquirido. La bacteria no evolucionada, o el plásmido no evolucionado están mostrados en negro. Bacteria adaptada al ambiente está mostrada en verde. La adquisición de un plásmido ColE1 en un hospedador sin evolucionar (portando o sin portar plásmidos) supone una disminución del *fitness* relativo, así como en la adquisición del replicón en una bacteria adaptada al ambiente. La adquisición de un plásmido en una bacteria portando un plásmido compensado, no afecta al *fitness* bacteriano.

4.3.5. Conclusiones

Este estudio aporta nueva información sobre la biología, origen el coste biológico, persistencia y mantenimiento de los plásmidos ColE1 en las poblaciones. Ya habíamos descrito que los plásmidos ColE1 solamente incurren un coste biológico cuando son adquiridos por primera vez en una bacteria. Si la bacteria coevoluciona con el replicón y el coste biológico es compensado, la adquisición de un nuevo plásmido ColE1 no supone ninguna carga metabólica para la bacteria, por tanto facilitando la persistencia bacterias multirresistentes en las poblaciones.

Discusión

5. Discusión

En esta sección voy a discutir los resultados más relevantes de los tres trabajos de los que se compone esta tesis doctoral. Los tres artículos se encuadran en la misma línea de investigación y cada trabajo surge como una pregunta del trabajo anterior. Todos ellos están orientados al objetivo de entender la adaptación de un plásmido tipo ColE1, el plásmido pB1000, a un hospedador en el que ha sido ampliamente descrito. A su vez, intentamos responder cómo es posible la estabilidad y persistencia de plásmidos tipo ColE1 en la naturaleza a pesar de su coste biológico en ausencia de presión selectiva que favorezca su estabilidad. Durante este apartado, no solamente nos centraremos en la adaptación de un plásmido a su hospedador, sino que discutiremos por qué la cohabitación plasmídica es un fenómeno tan altamente difundido en la naturaleza cuando, *a priori*, debido al coste biológico de los replicones, no debería ser un fenómeno conservado naturalmente.

5.1. Adaptación de pB1000 al ambiente: equilibrio entre el número de copias y el coste biológico

Uno de los resultados más relevantes de esta tesis es la plasticidad que muestran los plásmidos tipo ColE1 en función del medio y cómo el número de copias del replicón se adapta mediante diferentes mecanismos en función del medio a través del ajuste del número de copias del replicón mediante diferentes mecanismos.

5.1.1. Modulación del número de copias sin presión antibiótica

En el primer trabajo de esta tesis encontramos el primer ejemplo de la plasticidad de los plásmidos tipo ColE1: la cepa Rd de *H. influenzae* transformada mediante electroporación con el plásmido pB1000 extraído de *P. multocida* BB1038 (San Millan, Escudero *et al.* 2009), obteniendo Rd/pB1000. En este trabajo, 5 poblaciones de Rd/pB1000 fueron propagadas sin presión antibiótica en el medio nutritivo *Haemophilus Test Medium* (HTM) durante 200 generaciones. Para analizar cómo influye la presión antibiótica en la adaptación replicón-hospedador, 5 poblaciones Rd/pB1000 fueron propagadas durante 100 generaciones en HTM con presión

antibiótica –con 1/4 de la CMI a ampicilina mostrada por Rd/pB1000, *i.e.* 64 mg/l, que a su vez corresponde con la concentración de ampicilina máxima que se llega en los tratamientos *in vivo* (Meyers, Wilkinson *et al.* 1991)- y posteriormente fueron propagadas durante 100 generaciones más en HTM sin presión antibiótica. Finalmente, para ver la influencia del plásmido en la adaptación bacteriana al medio, propagamos 5 poblaciones de la bacteria Rd sin portar el plásmido durante 200 generaciones.

Tras 100 y 200 generaciones de Rd/pB1000 evolucionando sin presión antibiótica, el número de copias de pB1000 se redujo de 44,5 por célula (Desviación Estándar [DE]= 9,9) (Figura 21) en la cepa Rd/pB1000 parental a 31,06 (DE= 15,7) y 18,43 (DE= 2,3) respectivamente. Solamente el descenso del número de copias en la generación 200 fue significativamente diferente comparado con el número de copias de Rd/pB1000 parental (Figura 21). Al secuenciar el genoma de una población tras 100 y 200 generaciones, encontramos que la disminución del número de copias de pB1000 no se produce por ninguna mutación –ni inserción/delección, o reorganización genética- ya sea en el cromosoma o en el replicón, si no que se debe a la desventaja competitiva de aquellas bacterias con un mayor número de replicones.

En el tercer trabajo, tras evolucionar a la cepa Rd en HTM sin presión antibiótica, no observamos una reducción en el número de copias del replicón a lo largo del tiempo en ausencia de presión antibiótica y especulamos si puede ser debido a un bajo número de muestras medidas (solamente medimos el número de copias de una línea evolucionada 100 y 200 generaciones) o a una mutación cromosómica que afecte al número de copias. En este trabajo, además propagamos líneas portando pB1000 en cohabitación con pB1005 y pB1006. Estos plásmidos no reducen su número de copias en ausencia de presión antibiótica. Hay que resaltar que cuando introducimos estos replicones en la bacteria el coste biológico de pB1000 ya ha sido compensado y, por tanto, no es necesario reducir el número de copias de estos replicones para disminuir su coste biológico.

Por tanto, vemos como la ausencia de presión trabajos selecciona cepas con un número de copias menor que el de la cepa parental sin comprometer la estabilidad de pB1000 en la población. Como ya se ha demostrado anteriormente (Martinez, Cercenado *et al.* 1987) y vemos en los capítulos 2 y 3 de esta tesis doctoral, el número de copias de los replicones determina su coste biológico cuando se adquieren por la

cepa sin evolucionar. De este modo, pB1000 podría ver reducido su coste biológico aumentando su supervivencia en poblaciones en las que no existe presión antimicrobiana. Es importante recordar que la estabilidad de estos replicones depende de su coste biológico y del número de copias (Summers, Beton *et al.* 1993), e interesante ver el equilibrio mediante el que pB1000 optimiza su persistencia jugando con ambas variables. No obstante, hemos visto que el coste biológico de pB1000 se compensa sin presión antibiótica. Por ello, no debería ser necesario que el número de copias se viese reducido, ya que cómo vemos en el trabajo 3 de resultados, una vez que el coste biológico se ha compensado, la cepa Rd es capaz de mantener hasta 60 plásmidos tipo ColE1 sin comprometer su *fitness*. Por tanto, la reducción del número de copias podría estar relacionado con una modulación más fina de la replicación como consecuencia de la coevolución plásmido/hospedador.

5.1.2. Modulación del número de copias bajo presión antibiótica

Tras este primer ejemplo de plasticidad del replicón pB1000, nos fijamos en el comportamiento del plásmido en Rd/pB1000 sometido a presión antibiótica durante 100 generaciones, y su posterior re-adaptación al medio sin presión. El número de copias de pB1000 tras 100 generaciones con presión antibiótica aumentó *ca.* 2,5 veces, pasando de 44,5 copias por bacteria (DE= 9,9) a 104,8 (DE= 33,8). Tras su adaptación al medio sin antibiótico durante las siguientes 100 generaciones, el número de copias se redujo a valores similares a los de la Rd/pB1000 parental: 23,28 (DE= 14,8), disminuyendo de este modo su coste biológico Gullberg y colaboradores (Gullberg, Albrecht *et al.* 2014) demostraron que concentraciones sub-CMI mejoran el *fitness* de cepas portando plásmidos comparado con la cepa parental sin plásmido, pero ésta es la primera vez que se observa esta plasticidad en un replicón: cuando hay presión antibiótica en el medio, portar pB1000 supone una ventaja adaptativa para la cepa *H. influenzae* Rd y por tanto se seleccionan aquellas bacterias que llevan mayor número de replicones, mientras que, debido a su coste biológico, cuando no existe presión antibiótica en el medio, el número de replicones se reduce sin comprometer la estabilidad del replicón asegurando así la supervivencia de pB1000 en la población. Sorprendentemente, tras secuenciar el genoma de varias de las poblaciones evolucionadas, no encontramos ninguna mutación

en el cromosoma o en el plásmido que pudiese ser la responsable de estos cambios significativos en el número de copias.

En esta tesis no hemos encontrado el mecanismo por el cual se produce un aumento de copias de pB1000 en presencia de ampicilina. Tras secuenciar dos de las poblaciones evolucionadas en presencia de antibiótico, encontramos una mutación en un ARNt^{Arg} que podría estar implicado en el aumento del número de copias. No obstante, tras secuenciar 10 clones portando alto número de copias, no encontramos mutaciones asociados a ningún ARNt. Por tanto especulamos que el aumento del número de copias pueda deberse a eventos que alteran rutas metabólicas o bien a que, simplemente por mejoras del *fitness* en las cepas que portan mayor número de plásmidos pB1000 en presencia de ampicilina, éstas se seleccionan. Será interesante estudiar la causa concreta por la que la ampicilina aumenta el número de copias de pB1000. En 1986 se demostró como el cloranfenicol aumenta el número de copias de plásmidos tipo ColE1 desacoplando la transcripción de la traducción (Frenkel y Bremer 1986) y favoreciendo de ese modo la aparición del lazo-R entre el ADN plasmídico y el ARN pre-primer. Entender el mecanismo mediante el que la ampicilina afecta a plásmidos que no portan β -lactamasas (como pB1005 y pB1006) así como la influencia de otros antibióticos en los plásmidos tipo ColE1 será necesario para comprender el comportamiento de estos replicones cuando hay presión antibiótica en el medio. Independientemente del mecanismo subyacente, el hecho de que la ampicilina seleccione un aumento en el número de copias de un plásmido que porta resistencia a dicho antibiótico es muy revelador para ver el impacto en la resistencia a antibióticos de los tratamientos antimicrobianos *in vivo*.

5.1.3. Regulación del número de copias mediante la cohabitación de dos variantes de pB1000

En el segundo trabajo de esta tesis encontramos otro bonito ejemplo de la plasticidad de los plásmidos tipo ColE1, en particular de pB1000. Tras analizar detalladamente el cromatograma del origen de replicación del pB1000 aislado de la *P. multocida* BB1038, encontramos que coexistían dos pB1000 diferenciados solamente por un polimorfismo en el origen de replicación (*oriV*), concretamente en el nucleótido

3880. En numerosas ocasiones se ha escrito cómo mutaciones puntuales en el origen de los plásmidos tipo ColE1 modifican su número de copias –ya sea aumentándolo o disminuyéndolo [para más información ver el apartado 2.2.1 de esta tesis doctoral]- y a su vez permiten la cohabitación entre diferentes plásmidos (Novick 1987, Camps 2010).

En nuestro trabajo, encontramos cómo las dos variantes de pB1000 eran capaces de cohabitar en *H. influenzae* tras ser transformada mediante electroporación con ambas variantes de pB1000. Ambas variantes no solamente eran capaces de replicar autónomamente, sino que, además, cada variante de pB1000 actuaba en la cepa Rd como un plásmido independiente: su número de copias cohabitando en la cepa Rd después de la transformación era la suma del número de copias de cada una de las variantes cuando habitaban la célula por separado (ver análisis estadístico del trabajo número dos): número de copias del alelo A3880 = 14,31 (Error Estándar [EE]= 1,72), número de copias del alelo C3880 = 21,23 (EE= 1,63) y número de copias totales de los dos alelos cohabitando en la cepa Rd = 34,51 (EE= 4,26) (Figura 26). Por tanto, la mutación en el *oriV* es suficiente para que cada plásmido mantenga su replicación independientemente de que cohabite o no. Este aumento del número de copias tiene dos implicaciones directas: i) el nivel de resistencia, que está directamente relacionado con el número de copias, aumenta y ii) el *fitness* bacteriano decrece de manera inversamente proporcional al aumento de las copias en la bacteria (Figura 26). De este modo, cuando ambas variantes de pB1000 cohabitan, el nivel de resistencia a ampicilina aumenta generando una ventaja en presencia del antibiótico, pero el *fitness* bacteriano disminuye, suponiendo una desventaja en ausencia de presión antibiótica.

Tras analizar los datos obtenidos en el trabajo 1 (en ausencia de presión antibiótica el número de copias de pB1000 se reduce, pero en presencia de ampicilina se seleccionan las cepas portando mayor número de copias), teorizamos que bajo un régimen antibiótico la cepa Rd mantendría ambos alelos de pB1000 en heterozigosis, mientras que sin presión antibiótica se perdería uno de los dos alelos, mejorando de tal modo el *fitness* bacteriano –recordemos que ya que los plásmidos tipo ColE1 no tienen ningún mecanismo de segregación, su permanencia tras la duplicación celular depende de su número de copias (Ayala-Sanmartin y Gomez-Eichelmann 1989).

Tras propagar 5 poblaciones de Rd con ambos alelos durante 300 generaciones en HTM con y sin ampicilina en el medio (64 mg/l) vimos que (Figura 27): i) cuatro de

las cinco poblaciones evolucionadas sin presión antibiótica perdían una de las dos variantes de pB1000. Al disminuir el número de copias de pB1000 en ausencia de presión selectiva, la probabilidad de que aparezca un segregante sin una de las variantes de pB1000 aumenta. ii) Todas las poblaciones propagadas con presión antibiótica mantuvieron ambos alelos, ya que aquellas bacterias que portan más replicones son seleccionadas en presencia de ampicilina. En este trabajo observamos el mismo fenómeno visto en el trabajo 1 producido por la ampicilina sobre la cepa portando pB1000: aumenta el número de copias de cada variante de pB1000 y este aumento del número de copias reduce drásticamente la probabilidad de que aparezcan segregantes sin plásmidos (o sin una de las variantes). De este modo la presencia de ampicilina en el medio está seleccionando aquellas bacterias heterozigóticas que confieren mayor fenotipo de resistencia, o lo que es lo mismo, que presentan un mayor número de copias del replicón, lo que puede tener importantes repercusiones en la ecología del plásmido. La mutación en el *oriV* se produjo al azar (en ausencia o presencia de ampicilina) y sin presión antibiótica esta mutación se habría perdido en la población debido al coste biológico asociado a la misma. Sin embargo, resulta interesante ver cómo la presencia de ampicilina selecciona directamente la variante de pB1000.

Por tanto, en los capítulos 1 y 2 tenemos diversos ejemplos de la capacidad de modulación del número de copias de pB1000 determinado por el equilibrio número de copias-*fitness* bacteriano. La modulación del número de copias no solamente juega un papel importante reduciendo el coste biológico del replicón –ayudando a su permanencia en la población- sino que clínicamente es muy relevante: en presencia de antibiótico, las bacterias portando mayor número de copias son seleccionadas en la población; al producirse un aumento del número de copias, también se produce un aumento de la β -lactamasa ROB-1 en el medio y, por tanto, una mayor resistencia a ampicilina. A su vez, la ampicilina selecciona la aparición de genotipos que presenten mayor resistencia a β -lactámicos por un mecanismo diferente al aumento del número de copias: la estabilidad de heterozigosis en plásmidos tipo ColE1.

5.2. El incremento de la resistencia a ampicilina mediada por pB1000, algo más que plásmidos

A lo largo de los tres trabajos de la tesis vemos cómo la resistencia a ampicilina mediada por pB1000 se debe a dos factores: aumento del número de copias y mejoras en el crecimiento bacteriano.

5.2.1. Aumento del nivel de resistencia mediante un aumento del número de copias

Hemos discutido a lo largo de la tesis que el número de copias de pB1000 determina el nivel de resistencia a ampicilina (Figura 26). En el segundo trabajo encontramos cómo la variante C3880, con aproximadamente 14 copias por célula, mostraba una resistencia a ampicilina aproximada de 425 mg/L; la variante A3880, con 21 copias por cromosoma, confería alrededor de 840 mg/L de resistencia a ampicilina; y cuando ambas variantes cohabitaban, el número de copias era de 34, con una resistencia a ampicilina de 1100 mg/L aproximadamente. Se observa una relación lineal entre el número de copias y la resistencia a ampicilina. Dado que la resistencia a ampicilina se debe a la expresión de la β -lactamasa, un mayor número de copias producirá un aumento de β -lactamasa en el medio y por tanto una mayor hidrólisis de los antibióticos β -lactámicos. Esta relación lineal se produce cuando el replicón ha sido recientemente introducido en la cepa Rd. Sin embargo, si analizamos los perfiles de resistencia que presentan las poblaciones de los trabajos 1 y 2 propagadas con y sin presión antibiótica, vemos que existe un aumento gradual de su nivel de resistencia según van avanzando las generaciones (Figura 24, Figura 28). Tras descartar que el aumento del nivel de resistencia se deba a mutaciones cromosómicas –como puede ser en el gen *diana* de la ampicilina, *ftsI*- o plasmídicas –que podrían estar aumentando el nivel de expresión de la β -lactamasa-, encontramos que el nivel de resistencia aumenta mediante un novedoso mecanismo independiente del número de copias.

5.2.2. Aumento del nivel de resistencia mediante mejoras en el *fitness* bacteriano

El segundo mecanismo mediante el que la bacteria incrementa su nivel de resistencia no está relacionado con un aumento del número de copias de pB1000. En las poblaciones evolucionadas sin presión antibiótica durante 200 generaciones vemos cómo se produce una disminución del número de replicones de aproximadamente 2,5 veces (Figura 22), mientras que el nivel de resistencia a ampicilina prácticamente se duplica (CMI= 1075 mg/l ED= 458 mg/l). Del mismo modo, en las poblaciones que, tras ser propagadas bajo presión antibiótica, fueron propagadas durante 100 generaciones sin presión (Figura 20) el número de copias disminuyó a la mitad mientras que el nivel de resistencia aumentó hasta 1,843 mg/l (ED= 618 mg/l). Sin embargo, en ambas poblaciones se produjo una mejora del *fitness* bacteriano de *ca.* 20% (Figura 21). En el mismo trabajo, electroporamos pB1000 en una cepa de Rd que había mejorado su *fitness* un 11,23% tras ser evolucionada sin presión antibiótica, y tras adquirir el replicón la resistencia a ampicilina aumentó 400 mg/L frente a la cepa parental disminuyendo el número de copias de plásmidos a la mitad [de 44,5 copias por bacteria (DE= 9,9) a 16,47 (DE=6,52)].

Tras el análisis estadístico (ver trabajo 1), llegamos a la conclusión de que ambas variables –aumento del número de copias y mejoras en el *fitness* bacteriano– contribuían de manera independiente al aumento del nivel de resistencia en las poblaciones evolucionadas (Figura 25). Sin embargo, aun siendo independientes, este hecho solamente se apreció en las poblaciones de la cepa Rd evolucionadas con el plásmido pB1000: en las cinco poblaciones de Rd evolucionadas sin el plásmido, el nivel de resistencia se mantuvo (0,25 mg/l) durante todo el experimento, dejando de manifiesto que la evolución actúa sobre la asociación plásmido/bacteria pero no sobre la bacteria en sí misma.

Este trabajo describe por primera vez cómo la contribución de las mejoras en el *fitness* bacteriano y del aumento del número de copias de pB1000 determinan el fenotipo de resistencia de la bacteria portadora del replicón. Por tanto, un tratamiento antimicrobiano con ampicilina no solamente va a seleccionar a las bacterias que portan los replicones, sino que, además, va a mejorar su *fitness* y su nivel de resistencia,

provocando que los clones que sobrevivan al tratamiento antimicrobiano tengan más opciones de ocupar un nicho libre de competidores, y una vez que lleguen nuevos competidores al nicho, sean más capaces de competir por los recursos. Además, en este escenario, las bacterias que adquieran el plásmido tras un tiempo de habitar en ese nicho van a ser igualmente más competitivas al estar ya evolucionadas y ser su *fitness* mayor, favoreciéndose la diseminación y la persistencia de los replicones.

Finalmente, un hecho muy relevante para discutir el tercer trabajo de esta tesis es que en las poblaciones propagadas con y sin presión antibiótica (página x), el aumento del *fitness* bacteriano debido a la evolución/adaptación de las cepas compensará el coste biológico del replicón pB1000. Es decir, su coste biológico será despreciable y las poblaciones portando pB1000 crecerán al mismo ritmo que las poblaciones evolucionadas sin el replicón, manteniendo de este modo a los replicones en la población.

5.3. La cohabitación de plásmidos tipo ColE1 y la influencia de la compensación

Desde que en 2009 publicamos que la multirresistencia en *P. multocida* estaba causada por la cohabitación de varios plásmidos tipo ColE1 (San Millan, Escudero *et al.* 2009), siempre nos hemos preguntado cómo es posible la cohabitación de plásmidos tipo ColE1 a pesar de su alto coste biológico –incluso superior a plásmidos conjugativos (San Millan, Heilbron *et al.* 2014). Recientemente, con motivo de las mejoras tecnológicas y el consecuente aumento de trabajos basados en la secuenciación masiva, hemos visto que el fenómeno de la cohabitación entre plásmidos –no solamente entre plásmidos tipo ColE1– es un fenómeno muy prevalente en la naturaleza. Este hecho, *a priori*, no debería estar altamente conservado en la naturaleza: si un plásmido tiene un elevado coste biológico, la adquisición de nuevos plásmidos disminuirá de tal modo el *fitness* bacteriano que aquella bacteria portando más de un replicón solamente será favorecida bajo presión selectiva. Además, atendiendo a la paradoja de los plásmidos, se hace más difícil entender cómo estos replicones que cohabitan en la misma célula son capaces de mantenerse en la población.

En el tercer trabajo de esta tesis, por tanto, nos preguntamos cómo tenía lugar el fenómeno de la cohabitación de estos replicones y propusimos dos teorías diferentes: en

la primera, los plásmidos son adquiridos a la vez por una bacteria que previamente no portaba replicones tipo ColE1 y fenómenos epistáticos reducen el coste biológico de los distintos replicones, de tal modo que la bacteria que porta un replicón tiene el mismo *fitness* que aquella que porta dos o tres. Esta primera teoría estaba basada en los artículos de San Millan y Morton (Morton, Platt *et al.* 2014, San Millan, Heilbron *et al.* 2014) En la segunda teoría, se asume que una vez que el coste biológico de un primer replicón era compensado, la adquisición de otro plásmido de la misma familia, con el mismo sistema de replicación, no supone un coste adicional para la bacteria (San Millan, Toll-Riera *et al.* 2015).

5.3.1. Cohabitación plasmídica previa a la compensación del coste biológico

La cepa Rd fue transformada mediante electroporación con los plásmidos pB1000, pB1005 y pB1006 extraídos de la *P. multocida* BB1038 (San Millan, Escudero *et al.* 2009), consiguiendo cepas portando las 7 combinaciones plasmídicas posibles. Tras determinar el número de copias y la resistencia a ampicilina, estreptomicina y tetraciclina –recordemos que pB1000 porta la β -lactamasa ROB-1, pB1005 porta el gen de protección ribosomal *strA* y pB1006 codifica el gen *tet(O)*- comprobamos cómo cada plásmido mantenía su número de copias y su fenotipo de resistencia habitando la célula tanto en cohabitación como en solitario (Figura 26).

En el trabajo 2 de esta tesis, vimos cómo las dos variantes de pB1000, diferenciadas por un SNP en el *oriV*, se comportan como plásmidos independientes. Del mismo modo, en el tercer trabajo vemos que pB1000, pB1005 y pB1006 se comportan de manera independiente. Esto quiere decir que los ARNs que regulan su número de copias son lo suficientemente diferentes como para no interferir entre ellos, de tal modo que la expresión de los ARNs solamente afecta al plásmido que los codifica.

Cuando analizamos el coste biológico de los tres replicones vimos que, al igual que ocurría con las variables de pB1000, el coste biológico de los replicones era el mismo cuando habitaban la célula por separado que cuando cohabitaban con los otros replicones. Este hecho tiene dos lecturas: i) el coste biológico de los plásmidos tipo ColE1 viene determinado por su región conservada y no tanto por el gen de resistencia

que portan: atendiendo a la revisión del coste biológico producido por la THG (Baltrus, 2103) probablemente el coste de los plásmidos tipo ColE1 en Pasteurellaceae se deba al secuestro de elementos genéticos necesarios para la replicación y/o la transcripción o al secuestro de bloques energéticos como el ATP, (Baltrus 2013) y ii) no existen interacciones epistáticas entre plásmidos tipo ColE1 que puedan explicar el fenómeno de la cohabitación, de tal modo que la bacteria que porta tres replicones no será seleccionada en un ambiente sin presión antibiótica.

El hecho de que los replicones actúen de un modo independiente, incluso cuando su *oriV* solamente se diferencia en un nucleótido, supone un punto clave en el mantenimiento de estos replicones. Si analizamos las bases de datos, hasta noviembre de 2015 habían sido descritos en la familia Enterobacteriaceae 100 plásmidos tipo ColE1 (ver condiciones del análisis en los métodos del trabajo 3). Como hemos visto en la introducción, estos plásmidos tipo ColE1 constan de dos partes bien diferenciadas: una variable, en la que se portan todos los elementos genéticos adaptativos –como pueden ser genes de resistencia a antibióticos-, y una región conservada (alrededor de un 80% de homología entre todos ellos) en la que se portan el *oriV*, el *oriT*, las relaxasas –si las tuvieran- y el gen que codifica la proteína Rop –si la tuvieran. Por ello, especulamos que la persistencia de estos replicones está determinada sobre todo por su región conservada: existe muy poca divergencia entre los replicones descritos, su contenido en G+C es el mismo que el de las especies en las que son portados y el equilibrio coste biológico-número de copias –que es lo que determina la estabilidad de estos replicones- viene definido por la región conservada de estos plásmidos y no tanto por el gen que portan en la región variable. Además, la multirresistencia mediada por plásmidos se ve muy favorecida por el hecho de que dos plásmidos que son virtualmente iguales, pero que portan diferentes determinantes de resistencia a antibióticos, puedan cohabitar establemente en una misma bacteria.

5.3.2. Cohabitación plasmídica posterior a la compensación del coste biológico

La cohabitación plasmídica no se puede explicar mediante fenómenos epistáticos positivos. Como ya hemos visto, su coste biológico es el mismo cuando cohabitan que

cuando habitan la célula independientemente. Sin embargo, en el tercer trabajo demostramos cómo una vez que se ha compensado el coste biológico del plásmido pB1000, la cepa Rd es capaz de adquirir los plásmidos pB1005 y pB1006 –juntos o separados- sin ver comprometido su *fitness* (Figura 32).

Tras permitir la compensación del coste biológico de pB1000 –simplemente propagando la bacteria Rd portando pB1000 sin presión antibiótica durante 100 y 200 generaciones- transformamos los replicones pB1005 y pB1006. En ese momento las bacterias portando un pB1000 compensado, o un pB1000 compensado más pB1005, pB1006 o pB1005+pB1006, no presentaban diferencias estadísticamente significativas en *fitness*. Sorprendentemente las poblaciones bacterianas portando pB1000 compensado o portando pB1000 compensado más pB1005 o pB1006 tampoco tenían diferencias significativas en crecimiento. Es la primera vez que se ve cómo la compensación de un plásmido facilita la adquisición de uno o varios nuevo(s) replicones.

Como ya hemos discutido, el coste biológico de estos replicones viene determinado por su región conservada pero no por los genes de resistencia portados por ellos. Por tanto, se puede especular que la cohabitación de plásmidos tipo ColE1 es un proceso de selección por parentesco (*kin selection*): una vez compensado el coste biológico de un replicón, la adquisición de otro muy similar no supone para la bacteria ningún coste, ya que lo que supone un coste biológico asociado a los plásmidos el motivo por el que los plásmidos cuestan ya ha sido compensado. Serán necesarios próximos trabajos para ver el exactamente donde reside el coste biológico de los replicones y si, efectivamente, nos encontramos ante un proceso de selección por parentesco o la evolución compensatoria favorece la adquisición de nuevos plásmidos de otras familias. Dado que en la naturaleza encontramos numerosos ejemplos de asociación de plásmidos con diferentes tipos de replicación, como por ejemplo plásmidos tipo ColE1 e IncF (Lanza, de Toro *et al.* 2014), resultará interesante conocer las bases que permiten la cohabitación de estos replicones, ya que no es un fenómeno dirigido por el parentesco. Finalmente, puesto que las adaptaciones compensatorias se seleccionan al subsanar el coste biológico de los replicones y, analizando la bibliografía (Bjorkman y Andersson 2000, Gullberg, Cao *et al.* 2011), cuanto más coste biológico, mayor es la ventana de selección en la que pueden surgir mutaciones compensatorias, sería muy interesante saber si la presencia de plásmidos no compensados cohabitando,

sean o no de la misma familia, selecciona más rápidamente mutaciones compensatorias facilitando por tanto el fenómeno de la cohabitación. Esto es, estudiar si la suma total del coste biológico mostrado por todos los plásmidos cohabitando en una bacteria favorece la aparición de mutaciones compensatorias.

5.4. Tratamiento antimicrobiano erróneo, solventando la paradoja de los plásmidos

En las secciones 1 y 2 de la discusión hemos analizado cómo afecta un tratamiento antimicrobiano erróneo a una población bacteriana que porta plásmidos tipo ColE1: primero se seleccionarán las bacterias resistentes. Estas bacterias no solamente aumentarán el número de copias de los replicones, si no que mejorarán su *fitness* provocando finalmente un incremento de la resistencia al antibiótico. Al estar en un ambiente con menos competidores y tras mejorar su *fitness*, la población resistente podrá aumentar el nicho siendo más competitiva contra posibles nuevos competidores. Pero no solamente tendrá estas repercusiones: durante el periodo del tratamiento, al aumentar la población, será más probable que actúe la evolución compensatoria que solventen el coste biológico del replicón. En el caso de que en el nicho hubiese competidores portando otros replicones con diferentes determinantes de resistencia y la bacteria los adquiriera, estos replicones no tendrían ningún coste biológico adicional, y por tanto serían mantenidos en la población, además de que la bacteria sería ahora multirresistente. En conclusión, un tratamiento antimicrobiano erróneo no solamente supondrá un fallo terapéutico al no acabar con la infección, sino que además seleccionará a las bacterias más resistentes y facilitará la adquisición de multirresistencias mediadas por plásmidos en esa población inicial.

Conclusiones

6. Conclusiones

Las conclusiones de esta Tesis Doctoral son las siguientes.

1. El tratamiento antibiótico con ampicilina en la cepa Rd/pB1000 induce el incremento del número de copias de pB1000, generando un incremento del fenotipo de resistencia mostrado por la cepa portadora.
2. El nivel de resistencia a β -lactámicos de la cepa Rd/pB1000 está determinado por el número de copias de pB1000 por célula y por mejoras en el *fitness* bacteriano.
3. La cohabitación de dos variantes de pB1000 provoca un aumento de la resistencia a ampicilina como consecuencia del aumento del número de plásmidos. En ausencia de presión antibiótica, una de las dos variantes se pierde en la población, reduciendo el fenotipo de resistencia.
4. Cuando son adquiridos *de novo*, el coste biológico de los plásmidos tipo ColE1 es aditivo y depende directamente del número de copias.
5. La compensación del coste biológico del plásmido pB1000 ocurre en menos de 100 generaciones en ausencia de presión selectiva y facilita la adquisición de nuevos plásmidos tipo ColE1 sin un coste biológico adicional.

Bibliografía

7. Bibliografía

- Albarracin Orio, A. G., G. E. Pinas, P. R. Cortes, M. B. Cian y J. Echenique (2011). "Compensatory evolution of *pbp* mutations restores the fitness cost imposed by beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*." PLoS Pathogens **7**(2): e1002000.
- Alekshun, M. N. y S. B. Levy (2007). "Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance." Cell **128**(6): 1037-1050.
- Alvarado, A., M. P. Garcillan-Barcia y F. de la Cruz (2012). "A degenerate primer *MOB* typing (DPMT) method to classify gamma-proteobacterial plasmids in clinical and environmental settings." PLoS One **7**(7): e40438.
- Allen, H. K., J. Donato, H. H. Wang, K. A. Cloud-Hansen, J. Davies y J. Handelsman (2010). "Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments." Nature Reviews Microbiology **8**(4): 251-259.
- Aminov, R. I. (2009). "The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature." Environmental Microbiology **11**(12): 2970-2988.
- Andersson, D. I. (2016). *Evolution of Antibiotic Resistance*. The Princeton guide to evolution. J. B. Losos, Princeton University Press.
- Andersson, D. I. y D. Hughes (2010). "Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?" Nature Reviews Microbiology **8**(4): 260-271.
- Andersson, D. I. y D. Hughes (2014). "Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics." Nature Reviews Microbiology **12**(7): 465-478.
- Ayala-Sanmartin, J. y M. C. Gomez-Eichelmann (1989). "Stability of *ColE1*-like and *pBR322*-like plasmids in *Escherichia coli*." Molecular microbiology **3**(12): 1745-1752.
- Baltrus, D. A. (2013). "Exploring the costs of horizontal gene transfer." Trends in Ecology & Evolution **28**(8): 489-495.
- Baquero, F., J. L. Martinez y R. Canton (2008). "Antibiotics and antibiotic resistance in water environments." Current Opinion in Biotechnology **19**(3): 260-265.
- Baquero, F., M. C. Negri, M. I. Morosini y J. Blazquez (1998). "Antibiotic-selective environments." Clinical Infectious Diseases **27** Suppl 1: S5-11.
- Bassett, C. L. y S. R. Kushner (1984). "Exonucleases I, III, and V are required for stability of *ColE1*-related plasmids in *Escherichia coli*." Journal of Bacteriology **157**(2): 661-664.
- Beaber, J. W., B. Hochhut y M. K. Waldor (2004). "SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes." Nature **427**(6969): 72-74.
- Bellanger, X., H. Guilloteau, B. Breuil y C. Merlin (2014). "Natural microbial communities supporting the transfer of the *IncP-1* beta plasmid *pB10* exhibit a higher initial content of plasmids from the same incompatibility group." Frontiers in Microbiology **5**: 637.
- Benveniste, R. y J. Davies (1973). "Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria." Proceedings of the National Academy of Sciences **70**(8): 2276-2280.
- Bergstrom, C. T., M. Lipsitch y B. R. Levin (2000). "Natural selection, infectious transfer and the existence conditions for bacterial plasmids." Genetics **155**(4): 1505-1519.
- Bhagwat, A. S. y S. Person (1981). "Structure y properties of the region of homology between plasmids *pMB1* and *ColE1*." Molecular Genetics and Genomics **182**(3): 505-507.
- Bjorkman, J. y D. I. Andersson (2000). "The cost of antibiotic resistance from a bacterial perspective." Drug Resistance Updates **3**(4): 237-245.
- Bjorkman, J., D. Hughes y D. I. Andersson (1998). "Virulence of antibiotic-resistant

- Salmonella typhimurium*." Proceedings of the National Academy of Sciences **95**(7): 3949-3953.
- Bjorkman, J., I. Nagaev, O. G. Berg, D. Hughes y D. I. Andersson (2000). "Effects of environment on compensatory mutations to ameliorate costs of antibiotic resistance." Science **287**(5457): 1479-1482.
- Bjorkman, J., P. Samuelsson, D. I. Andersson y D. Hughes (1999). "Novel ribosomal mutations affecting translational accuracy, antibiotic resistance and virulence of *Salmonella typhimurium*." Molecular Microbiology **31**(1): 53-58.
- Blaby, I. K. y D. K. Summers (2009). "The role of FIS in the Rcd checkpoint and stable maintenance of plasmid ColE1." Microbiology **155**(Pt 8): 2676-2682.
- Blair, J. M., M. A. Webber, A. J. Baylay, D. O. Ogbolu y L. J. Piddock (2015). "Molecular mechanisms of antibiotic resistance." Nature Reviews Microbiology **13**(1): 42-51.
- Blanco, M., C. B. Gutiérrez-Martin, E. F. Rodríguez-Ferri, M. C. Roberts y J. Navas (2006). "Distribution of tetracycline resistance genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates from Spain." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **50**(2): 702-708.
- Blanco, M., K. Kadlec, C. B. Gutiérrez Martín, A. J. de la Fuente, S. Schwarz y J. Navas (2007). "Nucleotide sequence and transfer properties of two novel types of *Actinobacillus pleuropneumoniae* plasmids carrying the tetracycline resistance gene *tet(H)*." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **60**(4): 864-867.
- Bogdanovich, T., B. Bozdogan y P. C. Appelbaum (2006). "Effect of efflux on telithromycin and macrolide susceptibility in *Haemophilus influenzae*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **50**(3): 893-898.
- Bosse, J. T., Y. Li, S. Walker, T. Atherton, R. Fernandez Crespo, S. M. Williamson, J. Rogers, R. R. Chaudhuri, L. A. Weinert, O. Oshota, M. T. Holden, D. J. Maskell, A. W. Tucker, B. W. Wren, A. N. Rycroft, P. R. Langford y B. R. T. Consortium (2015). "Identification of *glrA14* in two distinct plasmids conferring trimethoprim resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **70**(8): 2217-2222.
- Bottery, M. J., A. J. Wood y M. A. Brockhurst (2016). "Selective Conditions for a Multidrug Resistance Plasmid Depend on the Sociality of Antibiotic Resistance." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **60**(4): 2524-2527.
- Bottger, E. C., B. Springer, M. Pletschette y P. Sander (1998). "Fitness of antibiotic-resistant microorganisms and compensatory mutations." Nature Medicine **4**(12): 1343-1344.
- Bouma, J. E. y R. E. Lenski (1988). "Evolution of a bacteria/plasmid association." Nature **335**(6188): 351-352.
- Boyd, A. C., J. A. Archer y D. J. Sherratt (1989). "Characterization of the ColE1 mobilization region and its protein products." Molecular Genetics & Genomics **217**(2-3): 488-498.
- Brantl, S. (2014). "Plasmid Replication Control by Antisense RNAs." Microbiology Spectrum **2**(4): 1-19.
- Bush, K., P. Courvalin, G. Dantas, J. Davies, B. Eisenstein, P. Huovinen, G. A. Jacoby, R. Kishony, B. N. Kreiswirth, E. Kutter, S. A. Lerner, S. Levy, K. Lewis, O. Lomovskaya, J. H. Miller, S. Mobashery, L. J. V. Piddock, S. Projan, C. M. Thomas, A. Tomasz, P. M. Tulkens, T. R. Walsh, J. D. Watson, J. Witkowski, W. Witte, G. Wright, P. Yeh y H. I. Zgurskaya (2011). "Tackling antibiotic resistance." Nature reviews. Microbiology **9**: 894-896.
- Bush, K. y G. A. Jacoby (2010). "Updated functional classification of beta-lactamases." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **54**(3): 969-976.
- Cabezón, E., J. I. Sastre y F. de la Cruz (1997). "Genetic evidence of a coupling role for the TraG protein family in bacterial conjugation." Molecular Genetics & Genomics **254**(4): 400-406.
- Camps, M. (2010). "Modulation of ColE1-like plasmid replication for recombinant gene expression." Recent patents on DNA & gene sequences **4**(1): 58-73.
- Cannatelli, A., A. Santos-Lopez, T. Giani, B. Gonzalez-Zorn y G. M. Rossolini (2015).

- "Polymyxin resistance caused by *mgrB* inactivation is not associated with significant biological cost in *Klebsiella pneumoniae*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **59**(5): 2898-2900.
- Cao, V., T. Lambert y P. Courvalin (2002). "ColE1-like plasmid *pIP843* of *Klebsiella pneumoniae* encoding extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-17." Antimicrobial agents and chemotherapy **46**(5): 1212-1217.
- Carr, I. M., J. I. Robinson, R. Dimitriou, A. F. Markham, A. W. Morgan y D. T. Bonthron (2009). "Inferring relative proportions of DNA variants from sequencing electropherograms." Bioinformatics **25**(24): 3244-3250.
- CDC (2013). Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States. <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>.
- Cesareni, G., M. Helmer-Citterich y L. Castagnoli (1991). "Control of ColE1 plasmid replication by antisense RNA." Trends in Genetics **7**(7): 230-235.
- Cesareni, G., M. A. Muesing y B. Polisky (1982). "Control of ColE1 DNA replication: the *rop* gene product negatively affects transcription from the replication primer promoter." Proceedings of the National Academy of Sciences **79**(20): 6313-6317.
- CLSI (2007). CLSI. Clinical y Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing-Seventeenth edition: Approved Standar M100-S17. Wayne, PA, USA, CLSI.
- Cohen, T., B. Sommers y M. Murray (2003). "The effect of drug resistance on the fitness of *Mycobacterium tuberculosis*." The Lancet Infectious Diseases **3**(1): 13-21.
- Connell, S. R., D. M. Tracz, K. H. Nierhaus y D. E. Taylor (2003). "Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **47**(12): 3675-3681.
- Cooper, T. F. y J. A. Heinemann (2000). "Postsegregational killing does not increase plasmid stability but acts to mediate the exclusion of competing plasmids." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(23): 12643-12648.
- Chakradhar, S. (2016). "Reservoirs of resistance: To understand why antibiotics fail, geneticists chase the 'resistome'." Nature Medicine **22**(10): 1069-1071.
- Charpentier, X., E. Kay, D. Schneider y H. A. Shuman (2011). "Antibiotics and UV radiation induce competence for natural transformation in *Legionella pneumophila*." Journal of Bacteriology **193**(5): 1114-1121.
- Chen, C. Y., R. L. Lindsey, T. P. Strobaugh, Jr., J. G. Frye y R. J. Meinersmann (2010). "Prevalence of ColE1-like plasmids and kanamycin resistance genes in *Salmonella enterica* serovars." Applied and Environmental Microbiology **76**(20): 6707-6714.
- Chen, C. Y., G. W. Nace, B. Solow y P. Fratamico (2007). "Complete nucleotide sequences of 84.5- and 3.2-kb plasmids in the multi-antibiotic resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium U302 strain G8430." Plasmid **57**(1): 29-43.
- Chen, C. Y., T. P. Strobaugh y J. G. Frye (2010). "Characterization of small ColE1-like plasmids conferring kanamycin resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium and Newport." Plasmid **63**(3): 150-154.
- Chiang, C. S., Y. C. Xu y H. Bremer (1991). "Role of DnaA protein during replication of plasmid *pBR322* in *Escherichia coli*." Molecular Genetics and Genomics **225**(3): 435-442.
- Chimerel, C., C. M. Field, S. Pinero-Fernandez, U. F. Keyser y D. K. Summers (2012). "Indole prevents *Escherichia coli* cell division by modulating membrane potential." Biochim Biophys Acta **1818**(7): 1590-1594.
- Chiou, C. S. y A. L. Jones (1995). "Expression and identification of the *strA-strB* gene pair from streptomycin-resistant *Erwinia amylovora*." Gene **152**(1): 47-51.
- D'Andrea, M. M., E. Literacka, A. Zioga, T. Giani, A. Baraniak, J. Fiett, E. Sadowy, P. T. Tassios, G. M. Rossolini, M. Gniadkowski y V. Miriagou (2011). "Evolution and spread of a

- multidrug-resistant Proteus mirabilis* clone with chromosomal AmpC-type cephalosporinases in Europe." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **55**(6): 2735-2742.
- D'Costa, V. M., C. E. King, L. Kalan, M. Morar, W. W. Sung, C. Schwarz, D. Froese, G. Zazula, F. Calmels, R. Debruyne, G. B. Golding, H. N. Poinar y G. D. Wright (2011). "Antibiotic resistance is ancient." Nature **477**(7365): 457-461.
- D'Costa, V. M., K. M. McGrann, D. W. Hughes y G. D. Wright (2006). "Sampling the antibiotic resistome." Science **311**(5759): 374-377.
- Dahlberg, C. y L. Chao (2003). "Amelioration of the cost of conjugative plasmid carriage in *Escherichia coli* K12." Genetics **165**(4): 1641-1649.
- Dantas, G., M. O. Sommer, R. D. Oluwasegun y G. M. Church (2008). "Bacteria subsisting on antibiotics." Science **320**(5872): 100-103.
- Davies, J. (2013). "Antibiotic Resistance in y from Nature." Microbiology Spectrum **1**(1).
- Davies, J. y D. Davies (2010). "Origins and evolution of antibiotic resistance." Microbiology and Molecular Biology Reviews **74**(3): 417-433.
- Davies, J., G. B. Spiegelman y G. Yim (2006). "The world of subinhibitory antibiotic concentrations." Current Opinion in Microbiology **9**(5): 445-453.
- de la Cruz, F., L. S. Frost, R. J. Meyer y E. L. Zechner (2010). "Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria." FEMS Microbiology Reviews **34**(1): 18-40.
- de Toro, M., I. Rodríguez, B. Rojo-Bezares, R. Helmuth, C. Torres, B. Guerra y Y. Sáenz (2013). "pMdT1, a small ColE1-like plasmid mobilizing a new variant of the *aac(6')-Ib-cr* gene in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." The Journal of antimicrobial chemotherapy **68**: 1277-1280.
- del Solar, G. y M. Espinosa (2000). "Plasmid copy number control: an ever-growing story." Molecular Microbiology **37**(3): 492-500.
- Demaneche, S., H. Sanguin, J. Pote, E. Navarro, D. Bernillon, P. Mavingui, W. Wildi, T. M. Vogel y P. Simonet (2008). "Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(10): 3957-3962.
- Diaz Ricci, J. C. y M. E. Hernandez (2000). "Plasmid effects on *Escherichia coli* metabolism." Critical Reviews in Biotechnology **20**(2): 79-108.
- Dixon, L. G., W. L. Albritton y P. J. Willson (1994). "An analysis of the complete nucleotide sequence of the *Haemophilus ducreyi* broad-host-range plasmid pLS88." Plasmid **32**(2): 228-232.
- Drlica, K. (2003). "The mutant selection window y antimicrobial resistance." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **52**(1): 11-17.
- Durao, P., S. Trindade, A. Sousa y I. Gordo (2015). "Multiple Resistance at No Cost: Rifampicin y Streptomycin a Dangerous Liaison in the Spread of Antibiotic Resistance." Molecular Biology and Evolution **32**(10): 2675-2680.
- eCDC (2013). European Center for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2012. http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/surveillance_reports/Pages/index.aspx.
- eCDC. (2014). "Antimicrobial resistance surveillance in Europe." <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-europe-2014.pdf>.
- Ederth, J., L. A. Isaksson y F. Abdulkarim (2002). "Origin-specific reduction of ColE1 plasmid copy number due to mutations in a distinct region of the *Escherichia coli* RNA polymerase." Molecular Genetics and Genomics **267**(5): 587-592.
- Eidam, C., A. Poehlein, A. Leimbach, G. B. Michael, K. Kadlec, H. Liesegang, R. Daniel, M. T. Sweeney, R. W. Murray, J. L. Watts y S. Schwarz (2015). "Analysis and comparative genomics of ICEMh1, a novel integrative and conjugative element (ICE) of *Mannheimia haemolytica*." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **70**(1): 93-97.
- Enne, V. I., P. M. Bennett, D. M. Livermore y L. M. C. Hall (2004). "Enhancement of host fitness by the *sul2*-coding plasmid p9123 in the absence

- of selective pressure." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **53**: 958-963.
- Enne, V. I., A. A. Delsol, G. R. Davis, S. L. Hayward, J. M. Roe y P. M. Bennett (2005). "Assessment of the fitness impacts on *Escherichia coli* of acquisition of antibiotic resistance genes encoded by different types of genetic element." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **56**(3): 544-551.
- Enne, V. I., D. M. Livermore, P. Stephens y L. M. Hall (2001). "Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction." Lancet **357**(9265): 1325-1328.
- Fernandez-Lopez, R. y F. de la Cruz (2014). "Rebooting the genome: The role of negative feedback in horizontal gene transfer." Mobile Genetic Elements **4**(6): 1-6.
- Fernandez-Lopez, R., I. Del Campo, C. Revilla, A. Cuevas y F. de la Cruz (2014). "Negative feedback and transcriptional overshooting in a regulatory network for horizontal gene transfer." PLoS Genetics **10**(2): e1004171.
- Fischbach, M. A. y C. T. Walsh (2009). "Antibiotics for emerging pathogens." Science **325**(5944): 1089-1093.
- Fitzwater, T., X. Y. Zhang, R. Elble y B. Polisky (1988). "Conditional high copy number *ColE1* mutants: resistance to *RNAI* inhibition in vivo and in vitro." The EMBO Journal **7**(10): 3289-3297.
- Fleming, A. (1929). "On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*." British journal of experimental pathology **10**(3): 226-236.
- Fram, M. S. y K. Belitz (2011). "Occurrence y concentrations of pharmaceutical compounds in groundwater used for public drinking-water supply in California." Science of the Total Environment **409**(18): 3409-3417.
- Francia, M. V., A. Varsaki, M. P. Garcillán-Barcia, A. Latorre, C. Drainas y F. de la Cruz (2004). "A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids." FEMS Microbiology Reviews **28**(1): 79-100.
- Franklin, K. y A. J. Clarke (2001). "Overexpression and characterization of the chromosomal aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase of *Providencia stuartii*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **45**(8): 2238-2244.
- Frenkel, L. y H. Bremer (1986). "Increased amplification of plasmids *pBR322* and *pBR327* by low concentrations of chloramphenicol." DNA **5**(6): 539-544.
- Freudenau, I., P. Lutter, R. Baier, M. Schlee, H. Bednarz, A. R. Lara y K. Niehaus (2015). "*ColE1*-Plasmid Production in *Escherichia coli*: Mathematical Simulation and Experimental Validation." Frontiers in Bioengineering and Biotechnology **3**: 1-14.
- Gaimster, H. y D. Summers (2015). "Plasmids in the driving seat: The regulatory RNA *Rcd* gives plasmid *ColE1* control over division and growth of its *E. coli* host." Plasmid **78**: 59-64.
- Galan, J. C., M. I. Morosini, M. R. Baquero, M. Reig y F. Baquero (2003). "*Haemophilus influenzae bla(ROB-1)* mutations in hypermutagenic *deltaampC* *Escherichia coli* conferring resistance to cefotaxime and beta-lactamase inhibitors and increased susceptibility to cefaclor." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **47**(8): 2551-2557.
- Gehring, K. B. y H. Nikaido (1989). "Existence and purification of porin heterotrimers of *Escherichia coli* *K12* *OmpC*, *OmpF*, and *PhoE* proteins." The Journal of Biological Chemistry **264**(5): 2810-2815.
- Gerdes, K., P. B. Rasmussen y S. Molin (1986). "Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **83**(10): 3116-3120.
- Gogarten, J. P. y J. P. Townsend (2005). "Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution." Nature Reviews Microbiology **3**(9): 679-687.
- Goh, E. B., G. Yim, W. Tsui, J. McClure, M. G. Surette y J. Davies (2002). "Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics." Proceedings of the National Academy of Sciences **99**(26): 17025-17030.

- Gonzalez Zorn, B. y J. A. Escudero (2012). "Ecology of antimicrobial resistance: humans, animals, food and environment." International Microbiol **15**: 101-109.
- Gregorova, D., M. Pravcova, R. Karpiskova y I. Rychlik (2002). "Plasmid pC present in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT14b strains encodes a restriction modification system." FEMS Microbiology Letters **214**(2): 195-198.
- Groh, J. L., Q. Luo, J. D. Ballard y L. R. Krumholz (2007). "Genes that enhance the ecological fitness of *Shewanella oneidensis* MR-1 in sediments reveal the value of antibiotic resistance." Applied and Environmental Microbiology **73**(2): 492-498.
- Guhathakurta, A., I. Viney y D. Summers (1996). "Accessory proteins impose site selectivity during *ColE1* dimer resolution." Molecular Microbiology **20**(3): 613-620.
- Gullberg, E., L. M. Albrecht, C. Karlsson, L. Sandegren y D. I. Andersson (2014). "Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals." MBio **5**(5): e01918-01914.
- Gullberg, E., S. Cao, O. G. Berg, C. Ilbäck, L. Sandegren, D. Hughes y D. I. Andersson (2011). "Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations." PLoS Pathogens **7**: e1002158.
- Gutierrez, B., J. A. Escudero, A. San Millan, L. Hidalgo, L. Carrilero, C. M. Ovejero, A. Santos-Lopez, D. Thomas-Lopez y B. Gonzalez-Zorn (2012). "Fitness cost and interference of *Arm/Rmt* aminoglycoside resistance methyltransferases with the *RsmF* housekeeping methyltransferase." Antimicrobial Agents and Chemotherapy.
- Guynet, C. y F. de la Cruz (2011). "Plasmid segregation without partition." Mobile Genetic Elements **1**: 236-241.
- Hall, A. R. y R. C. MacLean (2011). "Epistasis buffers the fitness effects of rifampicin- resistance mutations in *Pseudomonas aeruginosa*." Evolution **65**(8): 2370-2379.
- Hall, J. P., A. J. Wood, E. Harrison y M. A. Brockhurst (2016). "Source-sink plasmid transfer dynamics maintain gene mobility in soil bacterial communities." Proceedings of the National Academy of Sciences **113**(29): 8260-8265.
- Hanglord, C. L., C. T. Stang, T. L. Raivio y J. J. Dennis (2009). "The contribution of small cryptic plasmids to the antibiotic resistance of enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69." Canadian Journal of Microbiology **55**(11): 1229-1239.
- Harrison, E. y M. A. Brockhurst (2012). "Plasmid-mediated horizontal gene transfer is a coevolutionary process." Trends in Microbiology **20**: 262-267.
- Harrison, E., C. Dytham, J. P. Hall, D. Guymer, A. J. Spiers, S. Paterson y M. A. Brockhurst (2016). "Rapid compensatory evolution promotes the survival of conjugative plasmids." Mobile Genetic Elements **6**(3): e1179074.
- Harrison, E., D. Guymer, A. J. Spiers, S. Paterson y M. A. Brockhurst (2015). "Parallel compensatory evolution stabilizes plasmids across the parasitism-mutualism continuum." Current Biology **25**(15): 2034-2039.
- Harrison, E., V. Koufopanou, A. Burt y R. C. MacLean (2012). "The cost of copy number in a selfish genetic element: the 2-mum plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*." Journal of Evolutionary Biology **25**(11): 2348-2356.
- Hernandez-Arriaga, A. M., W. T. Chan, M. Espinosa y R. Diaz-Orejas (2014). "Conditional Activation of Toxin-Antitoxin Systems: Postsegregational Killing and Beyond." Microbiology Spectrum **2**(5).
- Hernando-Amado, S., P. Blanco, M. Alcalde-Rico, F. Corona, J. A. Reales-Calderon, M. B. Sanchez y J. L. Martinez (2016). "Multidrug efflux pumps as main players in intrinsic and acquired resistance to antimicrobials." Drug Resistance Updates **28**: 13-27.
- Hong, H. J., M. I. Hutchings, J. M. Neu, G. D. Wright, M. S. Paget y M. J. Buttner (2004). "Characterization of an inducible vancomycin resistance system in *Streptomyces coelicolor* reveals a novel gene (*vanK*) required for drug resistance." Molecular Microbiology **52**(4): 1107-1121.

- Hopwood, D. A. (2007). "How do antibiotic-producing bacteria ensure their self-resistance before antibiotic biosynthesis incapacitates them?" Molecular Microbiology **63**(4): 937-940.
- Hughes, D. and D. I. Andersson (2015). "Evolutionary consequences of drug resistance: shared principles across diverse targets and organisms." Nature Reviews in Genetics **16**(8): 459-471.
- Iguchi, A., N. R. Thomson, Y. Ogura, D. Saunders, T. Ooka, I. R. Henderson, D. Harris, M. Asadulghani, K. Kurokawa, P. Dean, B. Kenny, M. A. Quail, S. Thurston, G. Dougan, T. Hayashi, J. Parkhill y G. Frankel (2009). "Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69." Journal of Bacteriology **191**(1): 347-354.
- Jiang, L., X. Hu, T. Xu, H. Zhang, D. Sheng y D. Yin (2013). "Prevalence of antibiotic resistance genes and their relationship with antibiotics in the Huangpu River and the drinking water sources, Shanghai, China." Science of the Total Environment **458-460**: 267-272.
- Jung, Y. H. y Y. Lee (1995). "RNases in *ColE1* DNA metabolism." Molecular Biology Reports **22**(2-3): 195-200.
- Juteau, J. M., M. Sirois, A. A. Medeiros y R. C. Levesque (1991). "Molecular distribution of *ROB-I* beta-lactamase in *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **35**(7): 1397-1402.
- Kaczmarek, F. S., T. D. Gootz, F. Dib-Hajj, W. Shang, S. Hallowell y M. Cronan (2004). "Genetic and molecular characterization of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* with unusually high resistance to ampicillin." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **48**(5): 1630-1639.
- Kang, M., R. Zhou, L. Liu, P. R. Langford y H. Chen (2009). "Analysis of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* multi-resistance plasmid, pHB0503." Plasmid **61**(2): 135-139.
- Kehrenberg, C., K. L. Hopkins, E. J. Threlfall y S. Schwarz (2007). "Complete nucleotide sequence of a small *qnrS1*-carrying plasmid from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium DT193." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **60**(4): 903-905.
- Kehrenberg, C., D. Meunier, H. Targant, A. Cloeckert, S. Schwarz y J. Y. Madec (2006). "Plasmid-mediated florfenicol resistance in *Pasteurella trehalosi*." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **58**(1): 13-17.
- Kehrenberg, C. y S. Schwarz (2000). "Identification of a truncated, but functionally active *tet(H)* tetracycline resistance gene in *Pasteurella aerogenes* and *Pasteurella multocida*." FEMS Microbiology Letters **188**(2): 191-195.
- Kehrenberg, C. y S. Schwarz (2001). "Occurrence and linkage of genes coding for resistance to sulfonamides, streptomycin and chloramphenicol in bacteria of the genera *Pasteurella* and *Mannheimia*." FEMS Microbiology Letters **205**(2): 283-290.
- Kehrenberg, C. y S. Schwarz (2002). "Nucleotide sequence and organization of plasmid pMVSCS1 from *Mannheimia varigena*: identification of a multiresistance gene cluster." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **49**(2): 383-386.
- Khan, G. A., B. Berglund, K. M. Khan, P. E. Lindgren y J. Fick (2013). "Occurrence and abundance of antibiotics and resistance genes in rivers, canal and near drug formulation facilities-a study in Pakistan." PLoS One **8**(6): e62712.
- Kim, D. H., H. J. Kim, S. K. Park, S. J. Kong, Y. S. Kim, T. H. Kim, E. K. Kim, K. M. Lee, S. S. Lee, J. S. Park, W. J. Koh, C. H. Lee, J. Y. Kim y T. S. Shim (2008). "Treatment outcomes and long-term survival in patients with extensively drug-resistant tuberculosis." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine **178**(10): 1075-1082.
- Klevens, R. M., M. A. Morrison, J. Nadle, S. Petit, K. Gershman, S. Ray, L. H. Harrison, R. Lynfield, G. Dumyati, J. M. Townes, A. S. Craig, E. R. Zell, G. E. Fosheim, L. K. McDougal, R. B. Carey, S. K. Fridkin y M. I. Active Bacterial Core surveillance (2007). "Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States." Journal of the American Medical Association **298**(15): 1763-1771.
- Knopp, M. y D. I. Andersson (2015). "Amelioration of the Fitness Costs of Antibiotic

- Resistance Due To Reduced Outer Membrane Permeability by Upregulation of Alternative Porins.* Molecular Biology and Evolution **32**(12): 3252-3263.
- Kulakauskas, S., A. Lubys y S. D. Ehrlich (1995). "DNA restriction-modification systems mediate plasmid maintenance." Journal of Bacteriology **177**(12): 3451-3454.
- Lacatena, R. M. y G. Cesareni (1981). "Base pairing of RNA I with its complementary sequence in the primer precursor inhibits ColEI replication." Nature **294**(5842): 623-626.
- Lacy, M. K., W. Lu, X. Xu, P. R. Tessier, D. P. Nicolau, R. Quintiliani y C. H. Nightingale (1999). "Pharmacodynamic comparisons of levofloxacin, ciprofloxacin, and ampicillin against *Streptococcus pneumoniae* in an in vitro model of infection." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **43**(3): 672-677.
- Lalonde, G., J. F. Miller, L. S. Tompkins y P. O'Hanley (1989). "Transformation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and analysis of R factors by electroporation." American Journal of Veterinary Research **50**(11): 1957-1960.
- Lancashire, J. F., T. D. Terry, P. J. Blackall y M. P. Jennings (2005). "Plasmid-encoded Tet B tetracycline resistance in *Haemophilus parasuis*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **49**(5): 1927-1931.
- Lanza, V. F., M. de Toro, M. P. Garcillan-Barcia, A. Mora, J. Blanco, T. M. Coque and F. de la Cruz (2014). "Plasmid flux in *Escherichia coli* ST131 sublineages, analyzed by plasmid constellation network (PLACNET), a new method for plasmid reconstruction from whole genome sequences." PLoS Genetics **10**(12): e1004766.
- Larsson, D. G., C. de Pedro y N. Paxeus (2007). "Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals." Journal of Hazardous Materials **148**(3): 751-755.
- Lenski, R. E. (1991). "Quantifying fitness y gene stability in microorganisms." Biotechnology **15**: 173-192.
- Lenski, R. E. (1997). "The cost of antibiotic resistance--from the perspective of a bacterium." Ciba Foundation Symposium **207**: 131-140; discussion 141-151.
- Levin, B. R., V. Perrot y N. Walker (2000). "Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria." Genetics **154**: 985-997.
- Li, D., M. Yang, J. Hu, Y. Zhang, H. Chang y F. Jin (2008). "Determination of penicillin G and its degradation products in a penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river." Water Research **42**(1-2): 307-317.
- Lilly, J. y M. Camps (2015). "Mechanisms of Theta Plasmid Replication." Microbiology Spectrum **3**: 1-11.
- Linares, J. F., I. Gustafsson, F. Baquero y J. L. Martinez (2006). "Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(51): 19484-19489.
- Liu, J., C. Tan, J. Li, H. Chen, P. Xu, Q. He y W. Bei (2008). "Characterization of ISAp11, an insertion element identified from *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolate in China." Veterinary Microbiology **132**(3-4): 348-354.
- Liu, Y., Q. He, P. Chen y H. Chen (2011). "Multiresistance in *Haemophilus parasuis* is mediated by Small Plasmids." 430070.
- Livrelli, V., J. Peduzzi y B. Joly (1991). "Sequence and molecular characterization of the ROB-1 beta-lactamase gene from *Pasteurella haemolytica*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **35**(2): 242-251.
- Livrelli, V. O., A. Darfeuille-Richaud, C. D. Rich, B. H. Joly y J. L. Martel (1988). "Genetic determinant of the ROB-1 beta-lactamase in bovine and porcine *Pasteurella* strains." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **32**(8): 1282-1284.
- Loftie-Eaton, W., H. Yano, S. Burleigh, R. S. Simmons, J. M. Hughes, L. M. Rogers, S. S. Hunter, M. L. Settles, L. J. Forney, J. M. Ponciano y E. M. Top (2016). "Evolutionary Paths That Expand Plasmid Host-Range: Implications for Spread of Antibiotic Resistance." Molecular Biology and Evolution **33**(4): 885-897.

- Lopatkin, A. J., S. Huang, R. P. Smith, J. K. Srimani, T. A. Sysoeva, S. Bewick, D. K. Karig y L. You (2016). "Antibiotics as a selective driver for conjugation dynamics." Nature Microbiology **1**(6): 16044.
- Luo, N., S. Pereira, O. Sahin, J. Lin, S. Huang, L. Michel y Q. Zhang (2005). "Enhanced in vivo fitness of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* in the absence of antibiotic selection pressure." Proceedings of the National Academy of Sciences **102**(3): 541-546.
- Luthje, P., M. von Kockritz-Blickwede y S. Schwarz (2007). "Identification and characterization of nine novel types of small staphylococcal plasmids carrying the lincosamide nucleotidyltransferase gene *lnu(A)*." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **59**(4): 600-606.
- Macinga, D. R. y P. N. Rather (1999). "The chromosomal 2'-N-acetyltransferase of *Providencia stuartii*: physiological functions and genetic regulation." Frontiers in Bioscience **4**: D132-140.
- Maiden, M. C. (1998). "Horizontal genetic exchange, evolution, and spread of antibiotic resistance in bacteria." Clinical Infectious Diseases **27 Suppl 1**: S12-20.
- Marcusson, L. L., N. Frimodt-Moller y D. Hughes (2009). "Interplay in the selection of fluoroquinolone resistance and bacterial fitness." PLoS Pathogens **5**(8): e1000541.
- Martinez, J. L. (2008). "Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments." Science **321**(5887): 365-367.
- Martinez, J. L. y F. Baquero (2000). "Mutation frequencies and antibiotic resistance." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **44**(7): 1771-1777.
- Martinez, J. L., E. Cercenado, M. Rodriguez-Creixems, M. F. Vincente-Perez, A. Delgado-Iribarren y F. Baquero (1987). "Resistance to beta-lactam/clavulanate." Lancet **2**(8573): 1473.
- Martinez, J. L., A. Fajardo, L. Garmendia, A. Hernandez, J. F. Linares, L. Martinez-Solano y M. B. Sanchez (2009). "A global view of antibiotic resistance." FEMS Microbiology Reviews **33**(1): 44-65.
- Martinez, J. L., M. B. Sanchez, L. Martinez-Solano, A. Hernandez, L. Garmendia, A. Fajardo y C. Alvarez-Ortega (2009). "Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems." FEMS Microbiology Reviews **33**(2): 430-449.
- Masukata, H. y J. Tomizawa (1984). "Effects of point mutations on formation and structure of the RNA primer for *ColE1* DNA replication." Cell **36**(2): 513-522.
- Matter, D., A. Rossano, S. Limat, L. Vorlet-Fawer, I. Brodard y V. Perreten (2007). "Antimicrobial resistance profile of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus porcitisillorum*." Veterinary Microbiology **122**(1-2): 146-156.
- McVicker, G., T. K. Prajsnar, A. Williams, N. L. Wagner, M. Boots, S. A. Renshaw y S. J. Foster (2014). "Clonal expansion during *Staphylococcus aureus* infection dynamics reveals the effect of antibiotic intervention." PLoS Pathogens **10**(2): e1003959.
- Medeiros, A. A., R. Levesque y G. A. Jacoby (1986). "An animal source for the ROB-1 beta-lactamase of *Haemophilus influenzae* type b." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **29**(2): 212-215.
- Meyers, B. R., P. Wilkinson, M. H. Mendelson, S. Walsh, C. Bournazos y S. Z. Hirschman (1991). "Pharmacokinetics of ampicillin-sulbactam in healthy elderly and young volunteers." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **35**(10): 2098-2101.
- Moleres, J., A. Santos-López, I. Lázaro, J. Labairu, C. Prat, C. Ardanuy, B. González-Zorn, V. Aragon y J. Garmendia (2015). "Novel *bla*_{ROB-1}-Bearing Plasmid Conferring Resistance to β -Lactams in *Haemophilus parasuis* Isolates from Healthy Weaning Pigs." Applied and Environmental Microbiology **81**(9): 3255-3267.
- Morton, E. R., T. G. Platt, C. Fuqua y J. D. Bever (2014). "Non-additive costs and interactions alter the competitive dynamics of co-occurring ecologically distinct plasmids." Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences **281**: 20132173.
- Mouton, J. W., D. F. Brown, P. Apfalter, R. Canton, C. G. Giske, M. Ivanova, A. P.

- MacGowan, A. Rodloff, C. J. Soussy, M. Steinbakk y G. Kahlmeter (2012). "The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting clinical MIC breakpoints: the EUCAST approach." Clinical Microbiology and Infection **18**(3): E37-45.
- Munita, J. M. y C. A. Arias (2016). "Mechanisms of Antibiotic Resistance." Microbiology Spectrum **4**(2).
- Naito, S., T. Kitani, T. Ogawa, T. Okazaki y H. Uchida (1984). "Escherichia coli mutants suppressing replication-defective mutations of the ColE1 plasmid." Proceedings of the National Academy of Sciences **81**(2): 550-554.
- Naito, Y., T. Naito y I. Kobayashi (1998). "Selfish restriction modification genes: resistance of a resident R/M plasmid to displacement by an incompatible plasmid mediated by host killing." The Journal of Biological Chemistry **379**(4-5): 429-436.
- Nesme, J. y P. Simonet (2015). "The soil resistome: a critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria." Environmental Microbiology **17**(4): 913-930.
- Nikaido, H. (2009). "Multidrug resistance in bacteria." Annual Review of Biochemistry **78**: 119-146.
- Nodwell, J. R. (2007). "Novel links between antibiotic resistance and antibiotic production." Journal of Bacteriology **189**(10): 3683-3685.
- Norman, A., L. H. Hansen y S. J. Sorensen (2009). "Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool." Philosophical transactions of the Royal Society of London. **364**(1527): 2275-2289.
- Novick, R. P. (1987). "Plasmid incompatibility." Microbiology Reviews **51**(4): 381-395.
- Novick, R. P. y F. C. Hoppensteadt (1978). "On plasmid incompatibility." Plasmid **1**(4): 421-434.
- O'Brien, F. G., K. Yui Eto, R. J. Murphy, H. M. Fairhurst, G. W. Coombs, W. B. Grubb y J. P. Ramsay (2015). "Origin-of-transfer sequences facilitate mobilisation of non-conjugative antimicrobial-resistance plasmids in Staphylococcus aureus." Nucleic Acids Research **43**(16): 7971-7983.
- O'Neill, J. (2016). "TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY: FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS." Review on Antimicrobial Resistance.
- Ochman, H., J. G. Lawrence y E. A. Groisman (2000). "Lateral gene transfer y the nature of bacterial innovation." Nature **405**(6784): 299-304.
- Ozturk, H., E. Ozkirimli y A. Ozgur (2015). "Classification of Beta-lactamases and penicillin binding proteins using ligand-centric network models." PLoS One **10**(2): e0117874.
- Pallecchi, L., E. Riccobono, A. Mantella, C. Fernandez, F. Bartalesi, H. Rodriguez, E. Gotuzzo, A. Bartoloni y G. M. Rossolini (2011). "Small qnrB-harboring ColE-like plasmids widespread in commensal enterobacteria from a remote Amazonas population not exposed to antibiotics." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **66**(5): 1176-1178.
- Pallecchi, L., E. Riccobono, S. Sennati, A. Mantella, F. Bartalesi, C. Trigoso, E. Gotuzzo, A. Bartoloni y G. M. Rossolini (2010). "Characterization of small ColE-like plasmids mediating widespread dissemination of the qnrB19 gene in commensal enterobacteria." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **54**(2): 678-682.
- Pan, L. (2010). "A New ColE1-like Plasmid Group Revealed by Comparative Analysis of the Replication Proficient Fragments of Vibrionaceae Plasmids." Journal of Microbiology and Biotechnology **20**: 1163-1178.
- Panayotatos, N. (1984). "DNA replication regulated by the priming promoter." Nucleic Acids Research **12**(6): 2641-2648.
- Papagiannitsis, C. C., M. Dolejska, R. Izdebski, H. Dobiasova, V. Studentova, F. J. Esteves, L. P. Derde, M. J. Bonten, J. Hrabak y M. Gniadkowski (2015). "Characterization of pKP-M1144, a Novel ColE1-Like Plasmid Encoding IMP-8, GES-5, y BEL-1 beta-Lactamases, from a Klebsiella pneumoniae Sequence Type 252 Isolate." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **59**(8): 5065-5068.

- Patient, M. E. y D. K. Summers (1993). "ColE1 multimer formation triggers inhibition of *Escherichia coli* cell division." Molecular Microbiology **9**(5): 1089-1095.
- Patnaik, P. R. (2000). "An evaluation of models for the effect of plasmid copy number on bacterial growth rate." Biotechnology Letters **22**(21): 1719-1725.
- Paulsson, J. (2002). "Multileveled selection on plasmid replication." Genetics **161**(4): 1373-1384.
- Paulsson, J. y M. Ehrenberg (1998). "Trade-off between segregational stability and metabolic burden: a mathematical model of plasmid ColE1 replication control." Journal of Molecular Biology **279**(1): 73-88.
- Pena-Miller, R., R. Rodriguez-Gonzalez, R. C. MacLean y A. San Millan (2015). "Evaluating the effect of horizontal transmission on the stability of plasmids under different selection regimes." Mobile Genetic Elements **5**(3): 1-5.
- Phillips, G. J. y B. E. Funnell (2004). *Plasmid Biology*. Washington, DC, Amer Society for Microbiology.
- Pogliano, J., T. Q. Ho, Z. Zhong y D. R. Helinski (2001). "Multicopy plasmids are clustered and localized in *Escherichia coli*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**: 4486-4491.
- Poirel, L., J. W. Decousser y P. Nordmann (2003). "Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a bla(CTX-M) beta-lactamase gene." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **47**(9): 2938-2945.
- Porse, A., K. Schonning, C. Munck y M. O. Sommer (2016). "Survival and evolution of a large multidrug resistance plasmid in new clinical bacterial hosts." Molecular Biology and Evolution.
- Power, P. M., W. A. Sweetman, N. J. Gallacher, M. R. Woodhall, G. A. Kumar, E. R. Moxon y D. W. Hood (2009). "Simple sequence repeats in *Haemophilus influenzae*." Infection, Genetics and Evolution **9**(2): 216-228.
- Providenti, M. A., J. M. O'Brien, R. J. Ewing, E. S. Paterson y M. L. Smith (2006). "The copy-number of plasmids and other genetic elements can be determined by SYBR-Green-based quantitative real-time PCR." Journal of Microbiological Methods **65**(3): 476-487.
- Revilla, C., M. P. Garcillán-Barcia, R. Fernández-López, N. R. Thomson, M. Sanders, M. Cheung, C. M. Thomas y F. de la Cruz (2008). "Different Pathways to Acquiring Resistance Genes Illustrated by the Recent Evolution of IncW Plasmids." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **52**(4): 1472-1480.
- Reyes-Lamothe, R., T. Tran, D. Meas, L. Lee, A. M. Li, D. J. Sherratt y M. E. Tolmasky (2014). "High-copy bacterial plasmids diffuse in the nucleoid-free space, replicate stochastically and are randomly partitioned at cell division." Nucleic Acids Research **42**: 1042-1051.
- Rodriguez-Rojas, A., J. Rodriguez-Beltran, A. Couce y J. Blazquez (2013). "Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution." International Journal of Medical Microbiology **303**(6-7): 293-297.
- Rossolini, G. M., F. Arena, P. Pecile y S. Pollini (2014). "Update on the antibiotic resistance crisis." Current Opinion in Pharmacology **18**: 56-60.
- Rozhon, W., E. Petutschnig, M. Khan, D. K. Summers y B. Poppenberger (2010). "Frequency and diversity of small cryptic plasmids in the genus *Rahnella*." BMC Microbiology **10**: 56.
- Rozkov, A., C. A. Avignone-Rossa, P. F. Ertl, P. Jones, R. D. O'Kennedy, J. J. Smith, J. W. Dale y M. E. Bushell (2004). "Characterization of the metabolic burden on *Escherichia coli* DH1 cells imposed by the presence of a plasmid containing a gene therapy sequence." Biotechnology and Bioengineering **88**(7): 909-915.
- Sabik, J. F., J. L. Suit y S. E. Luria (1983). "cea-kil operon of the ColE1 plasmid." Journal of Bacteriology **153**(3): 1479-1485.
- San Millan, A. (2010). *Identificación, caracterización molecular y diseminación de mecanismos de resistencia a antibióticos en patógenos animales y humanos de la familia Pasteurellaceae*. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid.

- San Millan, A., J. A. Escudero, A. Catalan, S. Nieto, F. Farelo, M. Gibert, M. A. Moreno, L. Dominguez y B. Gonzalez-Zorn (2007). "Beta-lactam resistance in *Haemophilus parasuis* Is mediated by plasmid pB1000 bearing bla_{ROB-1}." Antimicrobial agents and chemotherapy **51**: 2260-2264.
- San Millan, A., J. A. Escudero, B. Gutierrez, L. Hidalgo, N. Garcia, M. Llagostera, L. Dominguez y B. Gonzalez-Zorn (2009). "Multiresistance in *Pasteurella multocida* is mediated by coexistence of small plasmids." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **53**: 3399-3404.
- San Millan, A., S. Garcia-Cobos, J. A. Escudero, L. Hidalgo, B. Gutierrez, L. Carrilero, J. Campos y B. Gonzalez-Zorn (2010). "Haemophilus influenzae clinical isolates with plasmid pB1000 bearing bla_{ROB-1}: fitness cost and interspecies dissemination." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **54**(4): 1506-1511.
- San Millan, A., M. Giufré, J. A. Escudero, L. Hidalgo, B. Gutierrez, M. Cerquetti y B. Gonzalez-Zorn (2011). "Contribution of ROB-1 and PBP3 mutations to the resistance phenotype of a β -lactamase-positive amoxicillin/clavulanic acid-resistant *Haemophilus influenzae* carrying plasmid pB1000 in Italy." The Journal of antimicrobial chemotherapy **66**: 96-99.
- San Millan, A., K. Heilbron y R. C. MacLean (2014). "Positive epistasis between co-infecting plasmids promotes plasmid survival in bacterial populations." The ISME Journal **8**(3): 601-612.
- San Millan, A., R. Peña-Miller, M. Toll-Riera, Z. V. Halbert, A. R. McLean, B. S. Cooper y R. C. MacLean (2014). "Positive selection and compensatory adaptation interact to stabilize non-transmissible plasmids." Nature Communications **5**: 5208.
- San Millan, A., A. Santos-Lopez, R. Ortega-Huedo, C. Bernabe-Balas, S. P. Kennedy y B. Gonzalez-Zorn (2015). "Small plasmid-mediated antibiotic resistance in *Haemophilus influenzae* is enhanced by increases in plasmid copy number and bacterial fitness." Antimicrobial Agents and Chemotherapy.
- San Millan, A., M. Toll-Riera, Q. Qi y R. C. MacLean (2015). "Interactions between horizontally acquired genes create a fitness cost in *Pseudomonas aeruginosa*." Nature Communications **6**: 6845.
- Sandegren, L. y D. I. Andersson (2009). "Bacterial gene amplification : implications for the evolution of antibiotic resistance." Nature Reviews Microbiology **7**, 578-588
- Sander, P., B. Springer, T. Prammananan, A. Sturmfels, M. Kappler, M. Pletschette and E. C. Bottger (2002). "Fitness cost of chromosomal drug resistance-conferring mutations." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **46**(5): 1204-1211.
- Schwarz, S., A. Loeffler y K. Kadlec (2016). "Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine." Veterinary Dermatology. doi: 10.1111/vde.12362. [Epub ahead of print]
- Selzer, G., T. Som, T. Itoh y J. Tomizawa (1983). "The origin of replication of plasmid p15A and comparative studies on the nucleotide sequences around the origin of related plasmids." Cell **32**(1): 119-129.
- Shintani, M., Z. K. Sanchez y K. Kimbara (2015). "Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy." Frontiers in Microbiology **6**: 242.
- Siguié, P., E. Gourbeyre, A. Varani, B. Ton-Hoang y M. Chandler (2015). "Everyman's Guide to Bacterial Insertion Sequences." Microbiology Spectrum **3**(2): MDNA3-0030-2014.
- Silva, R. F., S. C. Mendonça, L. M. Carvalho, A. M. Reis, I. Gordo, S. Trindade y F. Dionisio (2011). "Pervasive sign epistasis between conjugative plasmids y drug-resistance chromosomal mutations." PLoS Genetics **7**(7): e1002181.
- Singleton, P. y D. Sainsbury (2006). *Dictionary of microbiology and molecular biology*. Virginia, Wiley.
- Smillie, C., M. P. Garcillan-Barcia, M. V. Francia, E. P. Rocha y F. de la Cruz (2010). "Mobility of plasmids." Microbiology and Molecular Biology Reviews **74**(3): 434-452.

- Snyder, L. y W. Champness (2007). *Molecular genetics of bacteria*, ASM Press.
- Sommer, M. O., G. Dantas y G. M. Church (2009). "Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora." *Science* **325**(5944): 1128-1131.
- Sondergaard, A. y N. Norskov-Lauritsen (2016). "Contribution of PBP3 Substitutions and TEM-1, TEM-15, and ROB-1 Beta-Lactamases to Cefotaxime Resistance in *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae*." *Microbial Drug Resistance* **22**(4): 247-252.
- Song, J. S., J. H. Jeon, J. H. Lee, S. H. Jeong, B. C. Jeong, S. J. Kim, J. H. Lee y S. H. Lee (2005). "Molecular characterization of TEM-type beta-lactamases identified in cold-seep sediments of Edison Seamount (south of Lihir Island, Papua New Guinea)." *Journal of Microbiol* **43**(2): 172-178.
- Sorensen, S. J., M. Bailey, L. H. Hansen, N. Kroer y S. Wuertz (2005). "Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review." *Nature Reviews Microbiol* **3**(9): 700-710.
- Soucy, S. M., J. Huang y J. P. Gogarten (2015). "Horizontal gene transfer : building the web of life." *Nature reviews genetics* **16**, 472-482
- Sousa, A., C. Bourgard, L. M. Wahl y I. Gordo (2013). "Rates of transposition in *Escherichia coli*." *Biology letters* **9**: 20130838.
- Stirling, C. J., S. D. Colloms, J. F. Collins, G. Szatmari y D. J. Sherratt (1989). "*xerB*, an *Escherichia coli* gene required for plasmid *ColE1* site-specific recombination, is identical to *pepA*, encoding aminopeptidase A, a protein with substantial similarity to bovine lens leucine aminopeptidase." *The EMBO Journal* **8**: 1623-1627.
- Stirling, C. J., G. Szatmari, G. Stewart, M. C. Smith y D. J. Sherratt (1988). "The Arginina repressor is essential for plasmid-stabilizing site-specific recombination at the *ColE1* *cer* locus." *The EMBO Journal* **7**: 4389-4395.
- Stoesser, N., A. E. Sheppard, L. Pankhurst, N. De Maio, C. E. Moore, R. Sebra, P. Turner, L. W. Anson, A. Kasarskis, E. M. Batty, V. Kos, D. J. Wilson, R. Phetsouvanh, D. Wyllie, E. Sokurenko, A. R. Manges, T. J. Johnson, L. B. Price, T. E. Peto, J. R. Johnson, X. Didelot, A. S. Walker, D. W. Crook y G. Modernizing Medical Microbiology Informatics (2016). "Evolutionary History of the Global Emergence of the *Escherichia coli* Epidemic Clone ST131." *MBio* **7**(2): e02162.
- Summers, D. K., C. W. Beton y H. L. Withers (1993). "Multicopy plasmid instability: the dimer catastrophe hypothesis." *Molecular microbiology* **8**: 1031-1038.
- Summers, D. K. y D. J. Sherratt (1988). "Resolution of *ColE1* dimers requires a DNA sequence implicated in the three-dimensional organization of the *cer* site." *The EMBO journal* **7**(3): 851-858.
- Sundin, G. W. (2002). "Distinct recent lineages of the *strA*- *strB* streptomycin-resistance genes in clinical and environmental bacteria." *Curr Microbiol* **45**(1): 63-69.
- Sundqvist, M., P. Geli, D. I. Andersson, M. Sjolund-Karlsson, A. Runeheggen, H. Cars, K. Abelson-Storby, O. Cars y G. Kahlmeter (2010). "Little evidence for reversibility of trimethoprim resistance after a drastic reduction in trimethoprim use." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **65**(2): 350-360.
- Tahlan, K., S. K. Ahn, A. Sing, T. D. Bodnaruk, A. R. Willems, A. R. Davidson y J. R. Nodwell (2007). "Initiation of actinorhodin export in *Streptomyces coelicolor*." *Molecular Microbiology* **63**(4): 951-961.
- Tegetmeyer, H. E., S. C. Jones, P. R. Langford y N. Baltes (2008). "ISAplI, a novel insertion element of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, prevents ApxIV-based serological detection of serotype 7 strain AP76." *Veterinary Microbiology* **128**(3-4): 342-353.
- Thomas, C. M. (2000). "Paradigms of plasmid organization." *Molecular Microbiology* **37**(3): 485-491.
- Tomizawa, J. (1986). "Control of *ColE1* plasmid replication: binding of RNA I to RNA II and inhibition of primer formation." *Cell* **47**(1): 89-97.
- Tomizawa, J. (1990). "Control of *ColE1* plasmid replication. Interaction of Rom protein with an

- unstable complex formed by RNA I and RNA II." Journal of Molecular Biology **212**(4): 695-708.
- Tomizawa, J. y T. Itoh (1981). "Plasmid ColE1 incompatibility determined by interaction of RNA I with primer transcript." Proceedings of the National Academy of Sciences **78**(10): 6096-6100.
- Tomizawa, J. y T. Som (1984). "Control of ColE1 plasmid replication: enhancement of binding of RNA I to the primer transcript by the Rom protein." Cell **38**(3): 871-878.
- Tomizawa, J. I., H. Ohmori y R. E. Bird (1977). "Origin of replication of colicin E1 plasmid DNA." Proceedings of the National Academy of Sciences **74**(5): 1865-1869.
- Trindade, S., A. Sousa, K. B. Xavier, F. Dionisio, M. G. Ferreira y I. Gordo (2009). "Positive epistasis drives the acquisition of multidrug resistance." PLoS Genetics **5**: e1000578.
- Tristram, S., M. R. Jacobs y P. C. Appelbaum (2007). "Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*." Clin Microbiology Reviews **20**(2): 368-389.
- Tristram, S. G., R. Littlejohn y R. S. Bradbury (2010). "*bla*_{ROB-1} presence on pB1000 in *Haemophilus influenzae* is widespread, and variable cefaclor resistance is associated with altered penicillin-binding proteins." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **54**(11): 4945-4947.
- Ubeda, C., E. Maiques, E. Knecht, I. Lasa, R. P. Novick y J. R. Penades (2005). "Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci." Molecular Microbiology **56**(3): 836-844.
- Uhlin, B. E. y K. Nordstrom (1977). "R plasmid gene dosage effects in *Escherichia coli* K-12: copy mutants of the R plasmid R1drd-19." Plasmid **1**(1): 1-7.
- van den Elzen, P. J., M. J. Hakkaart, A. J. van Putten, H. H. Walters, E. Veltkamp y H. J. Nijkamp (1983). "Structure and regulation of gene expression of a Clo GL13 plasmid DNA region involved in plasmid segregation and incompatibility." Nucleic Acids Research **11**(24): 8791-8808.
- van Schaik, W. (2015). "The human gut resistome." Philosophical transactions of the Royal Society of London. **370**(1670): 20140087.
- Varsaki, A., H. K. Lamb, O. Eleftheriadou, E. Vandera, P. Thompson, G. Moncalián, F. de la Cruz, A. R. Hawkins y C. Drinas (2012). "Interaction between relaxase MbeA and accessory protein MbeC of the conjugally mobilizable plasmid ColE1." FEBS letters **586**: 675-679.
- Varsaki, A., M. Lucas, A. S. Afendra, C. Drinas y F. de la Cruz (2003). "Genetic and biochemical characterization of MbeA, the relaxase involved in plasmid ColE1 conjugative mobilization." Molecular Microbiology **48**(2): 481-493.
- Velappan, N., D. Sblattero, L. Chasteen, P. Pavlik y A. R. Bradbury (2007). "Plasmid incompatibility: more compatible than previously thought?" Protein Engineering, Design & Selection **20**(7): 309-313.
- Ventola, C. L. (2015). "The antibiotic resistance crisis: part 1: causes y threats." Pharmacy and Therapeutics **40**(4): 277-283.
- Vincent, A. T., J. G. Emond-Rheault, X. Barbeau, S. A. Attère, M. Frenette, P. Lague y S. J. Charette (2016). "Antibiotic resistance due to an unusual ColE1-type replicon plasmid in *Aeromonas salmonicida*." Microbiology **162**(6): 942-953.
- Vogwill, T. y R. C. MacLean (2015). "The genetic basis of the fitness costs of antimicrobial resistance: a meta-analysis approach." Evolutionary Applications **8**(3): 284-295.
- von Wintersdorff, C. J. H., J. Penders, J. M. van Niekerk, N. D. Mills, S. Majumder, L. B. van Alphen, P. H. M. Savelkoul y P. F. G. Wolffs (2016). "Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer." Frontiers in Microbiology **7**(173).
- Waksman, S. A. y H. B. Woodruff (1942). "Selective Antibiotic Action of Various Substances of Microbial Origin." Journal of Bacteriology **44**(3): 373-384.
- Walsh, F., S. G. Amyes y B. Duffy (2013). "Challenging the concept of bacteria subsisting

- on antibiotics." International Journal of Antimicrobial Agents **41**(6): 558-563.
- Wang, Y., P. Penkul y J. N. Milstein (2016). "Quantitative Localization Microscopy Reveals a Novel Organization of a High-Copy Number Plasmid." Biophysical journal **111**: 467-479.
- Wang, Z., G. Le, Y. Shi, G. Wegrzyn y B. Wrobel (2002). "A model for regulation of ColE1-like plasmid replication by uncharged ARNts in amino acid-starved *Escherichia coli* cells." Plasmid **47**: 69-78.
- Wang, Z., L. Xiang, J. Shao, A. Wegrzyn y G. Wegrzyn (2006). "Effects of the presence of ColE1 plasmid DNA in *Escherichia coli* on the host cell metabolism." Microbial Cell Factories **5**: 34.
- Wang, Z., Z. Yuan y U. R. Hengge (2004). "Processing of plasmid DNA with ColE1-like replication origin." Plasmid **51**(3): 149-161.
- Wang, Z., Z. Yuan, L. Xiang, J. Shao y G. Wegrzyn (2006). "ARNt-dependent cleavage of the ColE1 plasmid-encoded RNA I." Microbiology **152**(Pt 12): 3467-3476.
- Wegrzyn, G. y A. Wegrzyn (2008). "Is ARNt only a translation factor or also a regulator of other processes?" Journal of applied genetics **49**: 115-122.
- Werbowsky, O., R. Boratynski, A. Dekowska y T. Kaczorowski (2015). "Genetic analysis of maintenance of pEC156, a naturally occurring *Escherichia coli* plasmid that carries genes of the EcoVIII restriction-modification system." Plasmid **77**: 39-50.
- WHO (2015). "World Health Organization." <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>.
- Wilson, D. N. (2014). "Ribosome-targeting antibiotics y mechanisms of bacterial resistance." Nature Reviews Microbiology **12**(1): 35-48.
- Wright, C. L., R. A. Strugnell y A. L. Hodgson (1997). "Characterization of a *Pasteurella multocida* plasmid and its use to express recombinant proteins in *P. multocida*." Plasmid **37**(1): 65-79.
- Wright, G. D. (2007). "The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity." Nature Reviews Microbiology **5**(3): 175-186.
- Wróbel, B. y G. Wegrzyn (1998). "Replication regulation of ColE1-like plasmids in amino acid-starved *Escherichia coli*." Plasmid **39**: 48-62.
- Wu, Y. C. y S. T. Liu (2010). "A sequence that affects the copy number and stability of pSW200 and ColE1." Journal of Bacteriology **192**(14): 3654-3660.
- Xu, F., S. Lin-Chao y S. N. Cohen (1993). "The *Escherichia coli* *pcnB* gene promotes adenylation of antisense RNAI of ColE1-type plasmids in vivo and degradation of RNAI decay intermediates." Proceedings of the National Academy of Sciences **90**(14): 6756-6760.
- Yamada, Y., M. Yamada y A. Nakazawa (1995). "A ColE1-encoded gene directs entry exclusion of the plasmid." Journal of Bacteriology **177**(21): 6064-6068.
- Yang, Y. L. y B. Polisky (1999). "Allele-specific suppression of ColE1 high-copy-number mutants by a *rpoB* mutation of *Escherichia coli*." Plasmid **41**(1): 55-62.
- Yano, H., K. Wegrzyn, W. Loftie-Eaton, J. Johnson, G. E. Deckert, L. M. Rogers, I. Konieczny y E. M. Top (2016). "Evolved plasmid-host interactions reduce plasmid interference cost." Molecular Microbiology.
- Yavachev, L. y I. Ivanov (1988). "What does the homology between *E. coli* ARNts and RNAs controlling ColE1 plasmid replication mean?" Journal of Theoretical Biology **131**(2): 235-241.
- Ye, C., R. Lan, S. Xia, J. Zhang, Q. Sun, S. Zhang, H. Jing, L. Wang, Z. Li, Z. Zhou, A. Zhao, Z. Cui, J. Cao, D. Jin, L. Huang, Y. Wang, X. Luo, X. Bai, P. Wang, Q. Xu y J. Xu (2010). "Emergence of a new multidrug-resistant serotype X variant in an epidemic clone of *Shigella flexneri*." Journal of Clinical Microbiology **48**(2): 419-426.
- Zioga, A., J. M. Whichard, S. D. Kotsakis, L. S. Tzouvelekis, E. Tzelepi y V. Miriagou (2009). "CMY-31 and CMY-36 cephalosporinases encoded by ColE1-like plasmids." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **53**(3): 1256-1259.

